

최 중
연구보고서

제주산 감귤이용 고품질 식초발효기술 및
제품화연구

Studies on Citrus Vinegar for Developing
Standardization of Processing and Products

농촌진흥청

제주농업시험장

(대구가톨릭 대학교, 경북과학대학)

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “제주산 감귤이용 고품질 식초발효 기술 및 제품화연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 19 일

주관연구기관명 : 제주농업시험장

총괄연구책임자 : 김 한 용

세부연구책임자 : 김 한 용

연 구 원 : 김 승 화

연 구 원 : 최 영 훈

협동연구기관명 : 대구가톨릭대학교

협동연구책임자 : 최 경 호

연 구 원 : 조 성 희

연 구 원 : 문 철 호

협동연구기관명 : 경북과학대학

협동연구책임자 : 김 미 립

연 구 원 : 김 대 현

연 구 원 : 김 성 호

연 구 원 : 이 기 동

연 구 원 : 권 승 혁

연 구 원 : 정 지 숙

요 약 문

I. 제 목

제주산 감귤이용 고품질 식초발효 기술 및 제품화연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 제주도에서 매년 반복되고 있는 감귤생산량의 증감(增減)과 감귤 품질저하에 의한 생과소비의 위축은 제주도 감귤산업의 붕괴를 가져올 수 있으며 더욱이 가속화되고 있는 농산물 수입 개방화는 값싼 외국산 과실의 수입을 증가시켜 감귤뿐만 아니라 국내산 과실의 가격폭락 현상을 초래시키고 있다.

제주도에서 실시하고있는 감귤산업 보호 및 활성화를 위한 정책중 장단기 계획 안을 보면 단기적인 조치로 감귤생산 조정제 및 비상품 강제폐기제, 중·장기계획으로 2010년도까지 목표년도로 설정된 감귤원 5,000여ha의 연차적 폐원을 골자로 한 재배면적 축소(소요예산 900억원), 감귤원 휴식년제 도입을 위한 재배구조 개선, 복합처리 가공단지 조성을 통한 가공품 개발, 생산지 위주의 유통체계를 소비자와 소비지를 중심으로 전환한 유통구조개선, 공동출하, 공동정산제 도입으로 홍수출하 방지 등을 제시하였다. 그러나 농민들의 반발로 인해 여러 가지 입안된 정책의 효과가 불투명한 상태에 있고 가격의 등락이 심한 감귤의 특성으로 인해 중·장기대책의 실현 전망도 불투명한 것이 현실이다.

본 연구에서 추구하고있는 감귤을 대량소비 시킬 수 있는 가공품목의 개발이 이루어지면 감귤을 일정량이상 소비시켜 가격안정을 기할 수 있을 것이고 일부나마 현실 타개의 대안이 될 수 있으리라 본다.

지금까지 제주농업시험장의 상업화를 목적으로 한 기본 가공품의 개발 연구는 고부가가치 감귤가공품 개발을 위한 초석으로 볼 수 있다. 여기에 협력 연구기관의 기초 학문연구 및 실용화연구에 대한 know how를 첨가한다면 빠른 기간 내에 연구성과를 얻을 수 있을 것이고 신속히 상업생산으로의 전환이 가능케 되어 제주 감귤의 현실 타계에 크게 기여 할수 있을 것이다. 이러한 점을 전제로 하여 본격적인 연구가 착수되었다.

제주감귤이 생과(生果) 위주의 소비 패턴을 떠나 대량소비를 유발할 시킬 수 있는 구체적인 요건을 보면 감귤은 착즙이 용이하고 기능성 물질이 다량 함유된 과실로 가공품 개발 적합한 적성을 가지고 있다. 또한 본 과제로 설정한 감귤을 원료로 한 식초

및 식초산음료는 세계적으로도 예가 없는 가공품이기 때문에 품질 정도에 따라 경쟁력과 시장성을 갖추기가 용이하다. 제주감귤을 원료로 한 식초, 기능성 식초음료 및 다양한 감귤가공품 개발은 과잉생산에 의한 가격폭락을 방지하고 저장성이 떨어지는 감귤의 효율적 활용이 가능하며, 아울러 가공품은 지역 특산품으로서 관광상품의 역할 수행도 가능할 것이다.

과즙을 발효시켜 얻은 식용 겔은 북 유럽, Russia 및 Philippines 등지에서 dessert로 널리 애용하는 전통식품의 일종인데 세계적으로는 coconut을 원료로 사용한 식용 겔(Nata de coco)이 널리 이용되고 있으며 국내에서는 fruit cocktail 및 과자 제조용으로 상당량이 수입되고 있다. 현재 식용겔의 주 생산지는 Philippines으로서 1993년부터 Philippines의 수출품목 제 1위이며 일본과 대만이 주요 수입국이다. 일본은 1993년 11월의 월간 수입액이 836백만 dollar(TED case studies, National Economic and Development Authority of Philippines)에 달하고 있다.

감귤식초 및 관련 음료, 식용 겔 생산은 상호 연관성을 가진 업종으로 자본수요가 적어 중소기업 생산품목에 적합하며 환경에 미치는 영향이 적고 특히 감귤 겔생산은 온난한 기후를 필요로 하기 때문에 국내에서는 제주도가 적지이며 감귤식초와 식초산음료, 식용 겔 생산은 제주도가 추진중인 복합 처리가공단지에 적합한 업종으로 보여지며 생산공장을 지역에 유치함으로써 고용증대 및 지역경제 활성화에 기여할 것이다.

제주감귤은 단순한 농산물로서가 아니라 지역사회의 자긍심과 발전의 원동력으로 적합한 감귤가공품의 개발 효과는 감귤재배의 기초 강화, 감귤 재배농가의 안정적인 소득확보, 감귤재배 농민의 자긍심 고취, 복합처리가공단지 설치 등을 주요 정책과제로 설정한 행정력에 대한 신뢰감 회복, 가공공장 설치 및 운영에 따른 고용증대 등의 2차적 효과, 지역사회 안정과 지속적인 발전에 기여할 것이다. 제주도의 고유상품의 개발은 제주도의 인지도를 향상시키고, 관광산업에 시너지효과 및 새로운 감귤 가공품 개발의 촉매적 기능을 할 수 있으리라 본다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 제주농업의 주 작목인 감귤을 이용하여 국내외에 경쟁력 있는 식초, 식초산 음료 및 식용 겔을 개발하는 것을 주 내용이다.

연구범위는 산업체이전을 위한 생산기술 정립, 공장화를 위한 plant 설계 등을 주요 골자로 현지 생산시설 설치에 가능한 결과를 도출하여 제주감귤의 농업기반조성에

기여코자 설계되었다.

세부적인 범위로 식초용 원주개발은 제조방법의 표준화 수립을 위해 가공용 적품종 선발 및 숙기결정, 고품질 원주제조 방법 정립에 있다.

물성이 우수한 고품질의 감귤 식용겔 개발은 이미(異味)나 이취(異臭)가 없고 우수한 색상과 생산성이 높고, 경제성 높은 두께 6.0mm 이상의 Gel 생성균주 개발과 특히 외국산 Nata de coco와 비교하여 보다 우수한 제조방법 수립에 있다 .

타식초와 차별화된 감귤식초 및 식초산음료 개발은 연속 2단 숙성 발효법을 적용해도 발효가 원활한 균주를 개발하고 감귤 고유의 향미를 지닌 식초산 음료 제품 제조법을 정립시키는데 있다. 특히 외관이 우수한 제품 개발(이미(異味), 이취(異臭)가 없고 투명도가 높은 것), 그리고 밀봉상태로 2개월 이상 실온에 방치하여도 발효관련 침전물이 없는 보존력이 우수한 제품개발 등을 목표범위로 두고 시험을 수행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제주산 감귤의 수급조절을 가공을 통해 일부나마 역할을 시키기 위해서는 본 연구에서 도출된 감귤식초 및 식초산음료제조방법을 산업체 등지에 신속히 기술이전을 실시해야 한다. 그러기 위해서는 감귤가공관련단체나 업체(제주지방개발공사 등)에 연구성과를 신속히 알려줄 수 있는 체계를 마련하고 연구결과 정립된 핵심기술 및 성과물을 기준으로 업체나 농민들이 요청시 농림기술관리센타에서 지정하여 개발에 관련 된 것을 이전할 수 있는 체계를 마련 해야 할 것으로 사료된다.

감귤Gel은 물질 특성상 새로운 산업소재로서 가능성이 충분히 있어 다각적인 검토를 거쳐 이용성을 극대화 시킬수 있는 방법을 구상해야 한다.

감귤 식초산음료 제조방법은 검토 후 특허로 출원이 가능할 것으로 보여지고 연구중 검토된 산업화 공정 Flow chart 및 설계서는 언제 어디서든지 누구나 이용할 수 있도록 하여 제품을 생산하고자하는 업체 등지에 손쉽게 제공 할 수 있는 체제로 만들 필요가 있다.

- 국내외 특허 출원: 균주 및 제품특허 출원
- 신 감귤가공식품 marketing: 시판제품 생산 및 market test
- 개발된 기술응용: 국내산 과잉 생산 과실류를 이용한 발효제품 개발에의 적용
- 제주 현지 생산공장설치 협력
- 식용 겔의 응용연구 시작

SUMMARY

I. Title

Studies on Citrus Vinegor for Developing Standardization of Processing and Products.

II. Summary

In the future of citrus industry, It's too difficult matter that we are make an accurate map with scientific exactitude for great possibilities. Developing citrus wine to apply vinegor process can give the effect as increase the per capita consumption of citrus in potential demand. First of all, 'Miyagawa' was selected for standardization of wine making in several citrus varieties. In many device of juice extraction at Jeju's area, vertical basket press was more efficient than other methods about achieved 57.7% juice in quantities of yield. And then a continuous screw press was faster more effectively than other machines in connection with operating time. An undiluted juice of the whole diluted treatments was effective for increase the efficiency of fermentation. In many factor of related fermentation. Systematically many factors was related to improve the citrus wine quality such as temperature, time, juice type, amount of inoculation and so on. First of all, temperature is an important factor to increase the alcohol content in fermentation factors

.Strains of cellulose producing bacteria belong to *Gluconacetobacter hansenii* were isolated from tea fungus. Among them, large colony forming mutants, *G. hansenii* TL-2 and TL-2C were statically cultivated to ferment dietary cellulose gel from citrus juice. The bacterium optimally produced the gel by using citrus juice containing 10°Brix of sugar. Optimum pH and temperature was pH 3.0-4.0 and 30°C, respectively. Ethanol at 1.0% had synergic effect on gel production. By fermentation for 14 days under optimal conditions, the bacterium produced gel thick as 12-16mm and productivity was 137.8±9.7g.wet gel/L. During the fermentation, acids equivalent to 1.90±0.22% acetic acid were produced in the cultural broth. More than 6.0×10⁹ cells of gel producing bacteria were bound to

the gel per cm², judging from DNA content.

Gels produced from citrus juice contained 97.5% of water and softer than those produced from black tea extract and coconut juice. The gel was consisted of microfibrils thin as 0.1 μ m by diameter. The fiber maximally occupied 97.9% of dry gel. Purified gel resisted to enzymic digestion by amylases, hydrolysis by acids and alkalis, and was hardly solved by dilute acids, alkalis and various solvents. The fiber was consisted of carbon, hydrogen and oxygen. Its experimental formula was considered as CH₂O from the result of elementary analysis.

When Sprague-Dawley rats were fed dry powder of the gel as dietary fiber at the levels of 1 and 2 %(w/w), the rats show higher body weight gains, lower triglyceride levels in plasma and liver than the rats fed dietary pectin or cellulose. Cultural broth remained after finishing of gel fermentation drastically inhibited growth of several food-borne bacteria such as *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *S. typhimurium*.

It is clear from these results that isolated bacterial strains, *G. hansenii* TL-2 and TL-2C, are useful for production of dietary gel from citrus juice. The gel is a good dietary fiber having hypotriglyceridemic effect to improve lipid status in the body. But underlying usage of the gel awaits further investigations for its biochemical stability.

To utilize overproduction citrus effectively, response surface methodology (RSM) was applied to optimize and monitor the vinegar fermentation condition by two stage fermentation.

In the first stage, the fermentation conditions for maximum alcohol contents were 17.95°brix of sugar concentration, 23.94°C of fermentation temperature, and 74.53hr of fermentation time.

In the second stage, the optimum conditions for maximum acidity were 221.35rpm of agitation rate, 158.36hr of fermentation time, and 29.90°C of fermentation temperature.

CMY (citrus malomelo yeast)-28 and acetobacter sp. CV2 (citrus vinegar 2) separated from natural citrus wine and vinegar were used for alcohol and

vinegar fermentation.

Citric acid content was the highest, but acetic acid content apparently increased during vinegar fermentation. Hesperidin was not changed during vinegar fermentation, on the other hand naringin was not detected.

The major organic acid in the citrus vinegar was acetic acid with minor citric, lactic, malic, tartaric, oxalic, succinic, and ascorbic acids.

The optimum mix percentages for maximum taste of citrus vinegar beverage were as followed ; citrus concentration juice(60°brix) 3.75, citrus vinegar 2, liquid fructose 12, sugar 2.5, calcium lactate 0.87, citric acid 0.65, orange flavor 0.1, vitamic C 0.015, xanthan gum 0.05, and dist water 78.

CONTENTS

Part I Introduction	1
Chapter 1. An aim in this research	1
Chapter 2. Necessity and range in this research	2
Part II the present condition of citrus vinegor in home and abroad	5
Part III Results	6
Chapter 1. Developing the citrus wine for making vinegar	6
Chapter 2. Gels produced from citrus juice	29
Chapter 3. Development of citrus vinegar and citrus vinegar beverage ...	91
Part IV Extent of reached the goal and contribute to other field	136
Part V Apply the result of this study	138
Part VI Information gathering during carry out this study	139
Part VII Reference	140

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 1 절	연구개발의 목적	1
제 2 절	필요성 및 범위	3
제 2 장	국내외 기술개발 현황	5
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	6
제 1 절	감귤식초용 원주개발	6
제 2 절	고품질 감귤 식용껍 개발	29
제 3 절	감귤식초 및 식초산음료 개발	91
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	136
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	138
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	139
제 7 장	참고문헌	140

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

국내 감귤생산량의 증가와 감귤 생과소비의 위축은 제주 감귤 산업의 붕괴를 가져올 수 있으며 더욱이 WTO체제의 출범에 의한 개방화 경쟁체제의 확대는 외국산 수입과실의 증가에 따른 국내산 감귤가격의 폭락현상이 초래될 수 있다. 2002년도산 가공용 감귤의 경우를 보면 수매가가 생산비의 50%이하도 못 미치는 금액이었으며 이것도 물량이 넘쳐 가공공장 등지에서 선별하여 수매되었다.

이에 따라 제주도는 감귤산업을 보호하기 위한 응급조치와 중·장기계획을 입안하였는데 우선 응급조치로 감귤생산 조정제 및 비상품 강제폐기제, 중·장기계획으로 완성 목표년도를 2010년까지 감귤원 5,000여ha를 연차적으로 폐원시키는 것을 골자로 한 재배면적 축소조정(소요예산 900억원), 감귤원 휴식년제 도입을 위한 재배구조 개선, 복합처리 가공단지 조성을 통한 가공품 개발, 생산지 위주의 유통체계를 소비자와 소비지를 중심으로 전환한 유통구조개선, 공동출하, 공동정산제 도입으로 홍수출하 방지 등을 제시하였다. 그러나 농민의 반발 등으로 인한 응급조치의 효과가 불투명한 상태에 있고 가격의 등락이 심한 감귤의 특성상 중·장기대책의 전망도 불투명한 현실이다.

위와 같은 어려움에 처한 감귤 산업을 살리기 위해서는 다방면으로 감귤의 이용도를 확대 시켜야 한다. 우선 한 분야로 시장성 있는 가공품을 개발한다면 일정량의 수매를 가능케 하여 감귤가격안정을 부여 일부나마 현실타개의 대책이 될 수 있으리라 본다.

제주에서 생산되는 감귤은 유기산함량이 높고 Vitamin C, 정유성분 (limonene, linalool, terpineol 등), 카로노이드류, 플라보노이드류(hesperidin, rutin, naringin 등) 및 알카로이드류와 같은 기능성 물질을 다량 함유한 과실로 적합한 가공품 개발에 의한 현재의 생과(生果) 위주의 소비 패턴을 떠나 대량소비를 유발할 수 있는 자원이다.

제주농업시험장 가공연구의 기본 틀은 고부가가치의 감귤가공품목개발을 위한 기초 연구에 국한 되어왔다. 여기에 학계, 타연구기관, 산업체 등의 know how를 덧 붙여진다면 빠른 기간 내에 연구성과가 상업생산으로의 전환이 가능케 될 것이고 제주 감귤의 현실 타계에 기여 할 것으로 사료되어 본연구가 시작되었다.

감귤을 원료로 한 식초 및 식초산음료는 세계적으로도 예가 없는 가공품이기 때문에 품질 정도에 따라 경쟁력과 시장성을 갖추기가 용이하다. 제주감귤을 원료로 한 식초, 기능성 식초음료 및 다양한 감귤가공품 개발은 과잉생산에 의한 가격폭락을 방지하고 저장성이 떨어지는 감귤의 효율적 활용이 가능하며 아울러 가공품은 지역 특산품으로서 관광상품의 역할 수행도 가능할 것이다.

과즙발효에 의해 만들어지는 식용겔은 Russia를 위시한 북 유럽과 Philippines등의 동남아 지역에서 dessert로 널리 애용하는 전통식품이다. 세계적으로는 coconut을 원료로 하여 생산된 식용겔(Nata de coco)이 널리 이용되며 국내에서는 fruit cocktail 및 과자 제조용으로 상당량이 수입되고 있다. 현재 식용겔의 주 생산지는 Philippines으로서 1993년부터 Philippines의 수출품목 제 1위이며 일본과 대만이 주요 수입국이다. 일본은 1993년 11월의 월간 수입액이 836백만 dollar(TED case studies, National Economic and Development Authority of Philippines)에 달하고 있다. 감귤식초와 식용겔제법은 상호 연관성을 가진 업종으로 자본 수요가 적어 중소기업 생산품목에 적합하다. 제조방법상 환경에 미치는 영향이 적고 감귤 겔 생산은 온난한 기후를 필요로 하기 때문에 국내에서는 제주도가 적지로 보여진다.

감귤식초와 식초산 음료, 식용 겔 생산은 제주도가 추진중인 복합 처리가공단지에 적합한 업종으로 보여지며 생산공장을 지역에 유치함으로써 고용증대 및 지역경제 활성화에 기여가 가능 할 것으로 추정된다.

제주감귤은 단순한 농산물로서가 아니라 지역사회의 자긍심과 발전의 원동력으로 적합한 감귤가공품의 개발 효과는 감귤재배의 기초 강화, 감귤 재배농가의 안정적인 소득확보, 감귤재배 농민의 자긍심 고취, 복합처리가공단지 설치 등을 주요 정책과제로 설정한 행정력에 대한 신뢰감 회복, 가공공장 설치 및 운영에 따른 고용증대 등의 2차적 효과, 지역사회 안정과 지속적인 발전에 기여할 것이다.

제 2 절 필요성 및 범위

본 연구는 제주감귤을 이용한 경쟁력 있는 식초, 식초산 음료 및 식용 겔을 개발하고 이의 생산에 필요한 생산기술, plant 설계 등을 정립코자 연구되었다. 도출된 연구 결과는 현지 생산시설 설치에 협력하여 제주감귤의 가공산업 기반조성에 기여가 가능할 것이다.

본연구의 범위는 식초용원주 제조의 표준화를 위해서는 원주제조에 적합한 적품종 및 숙기선발과 제조법 정립. 이미(異味)나 이취(異臭)가 없고 색상이 우수하며 생산성 및 경제성 높은 두께 6.0mm 이상의 Gel을 생성 시킬수 있는 균주선발 및 외국산 Nata de coco와 비교하여 보다 물성이 우수한 고품질의 감귤 식용겔 제조방법 개발.

타식초와 차별되는 연속 2단 숙성 발효법을 적용시켜 발효시킬 수 있는 균주개발과 감귤고유의 향미를 지니고 우수한 외관의 식초산 음료 제품 개발(이미(異味), 이취(異臭)가 없고 투명도가 높은 것)에 있다. 또한 밀봉상태로 2개월 이상 실온에 방치하여도 발효관련 침전물이 없는 보존력이 우수하고 타 식초에 비해 고품질의 감귤식초 및 식초산음료제조법 개발에 범위를 두고 시험을 수행하였다.

○ 원주발효용 감귤과즙 품질기준설정

- 감귤의 품종, 숙기에 따른 원주 발효력 비교
- 착즙방법에 따른 착즙율 검토 및 원주용 과즙제조 방법의 표준화
- 기 개발 감귤주용 CMY-28균주의 온도별 발효속도 및 식초용의 원주조성검토

○ 감귤식용겔용 균주선발 및 발효조건 검토

- 식용 겔 생산균 분류동정 및 발효조건 검토

○ 발효균주 선발 및 개선

- 감귤부착 식초발효 미생물 분리 및 동정
- 보조 발효균 선발 및 균주별 발효특성 검토

○ 감귤 기능성 성분 유지 식초 발효기술 개발

- 나리진, 헤스페리딘성분의 발효 단계별 이행을 분석

○ 원주 발효공정 개선

- 복합 발효에 의한 원주발효공정 개선 및 발효조 온도별 발효 속도측정

○ 산업화를 위한 안전성 검정 및 기능성 검정

- Ames test 및 생균수 검정과 항균력, 혈전 용해성 검정 및 동물실험
- 산업화를 위한 경제성 자료작성과 이용성 검토

○ 식초 발효 산업화 공정 개발

- 최적 발효조건 설정을 위한 개발범위로 Pilot plant 및 상업생산 규모 설정
- 상업생산규모 확정을 위한 개발품의 시장성조사 :

○ 시제품생산 및 상업 생산 공정개발

- Plant 생산 시도 - 감귤식초 및 drink 류
- 생산공정보완 및 유통기간 설정을 위한 저장성검토

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내에서의 식초 및 식초산 음료 기술개발 현황을 보면 상업적으로는 주정초를 위시하여 맥아초, 사과초, 포도초, 쌀식초 및 주박초가 생산되고 있다. 세계적으로 보면 주정초가 대중(大宗)을 이루고 천연 과즙식초는 포도식초를 제외하면 과실이용 식초 생산의 예가 적으나 국내에서는 특이하게도 천연 감식초가 다량 제조되고 있다. 천연 과즙 식초는 원재료가 가진 문제점(색소, cellulose성분, 비 acetate계 유기산, 비 발효성 당, 특히 향미성분 등)과 micro 단위의 여과를 필요로 하는 공정상의 문제점 때문에 발효가 어려운 것으로 평가되고 있는데 우리나라와 인접하고 있는 일본에서도 포도식초를 100% 과즙으로 발효하지 못하고 30% 희석액을 사용하고 있다. 국내에서 제조되는 포도식초와 감식초가 조미식품으로서의 당연한 지위를 얻지 못하고 건강식품의 범주로 유통되고 있는 것도 여기에 원인이 있다.

천연과즙 식초 가공품에 관한 연구는 주로 원료의 종류 및 제조법에 따른 품질변화에 집중되고있고 대부분의 연구가 상업생산과 연계되지 못하고 실험적 차원에 머물고 있는 실정이다.

식용 겔에 대한 국내 생산공장은 전무한 상황이나 Philippines에서는 coconut gel 생산과 관련된 균주개발 등의 기술적 업무를 Bureau of Plant & Industry(BPI) 산하 Lab. of Microbiology에서 관리되고 있다. Philippine에서는 산업보호의 차원에서 발효 균주 및 생산기술의 확산 억제와 외국인의 생산현장 출입을 엄격히 통제(1999년 10월 Manila 주재 한국대사관 확인)하고 있는 실정이다. 실질적으로 과즙을 이용한 식용 겔 생산에 관한 연구는 세계적으로도 예가 적은데 Russia에서 tea fungus를 이용하여 vitamin을 함유한 겔 생산을, 일본에서는 Acetobacter xylinum을 사용한 딸기 겔 생산이 보고되고 있다. 대구가톨릭대학교에서는 독자적으로 분리한 겔 생산균주(Gluconoacetobacter hansenii TL-2)를 이용하여 실험실적으로 과즙(coconut, 포도, 감), 야채(호박) 및 다류(홍차, 감잎차)의 겔 제조에 성공한 바 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 감귤식초용 원주개발

1. 연구목적

감귤 식초용 원주개발은 고품질의 식초를 생산하기 위한 기본적인 단계이다. 또한 효율적이고 경제적인 생산방법이 구축되어야 지속적인 생산이 가능해 질 수 있다.

본 연구의 기본 목적은 현재 제주도에서 가장 많이 생산되고있는 감귤중 가장 식초용 원주생산에 적합한 품종 선발과 숙기선발로 고품질의 원주를 제조할 수 있는 기본적인 조건을 설정하는데 있다. 또한 주스제조에 가장 적합한 방법을 찾아내어 경제성 있고 그리고 원주발효에 적합한 조건을 설정에 있다.

식초용원주 제조의 표준화 수립은 식초제조를 원활하게 할 수 있으며 식초를 이용한 다양한 제품개발이 가능하다.

2. 연구배경 및 개요

감귤을 원료로 한 식초 및 식초산음료개발에 대한 체계적인 연구는 세계적으로도 예가 없기 때문에 체계적인 산업화공정이 수립된다면 개발품의 품질 정도에 따라 경쟁력과 시장성을 갖추기가 용이하다.

제주감귤을 원료로 한 식초, 기능성 식초산음료 및 다양한 감귤가공품 개발은 과잉 생산에 의한 가격폭락을 방지하는데 일조를 할 것으로 보여진다. 또한 저장성이 떨어지는 감귤의 효율적 관리 및 활용을 가능케 할 수 있으며 아울러 지역 특산품으로서 관광상품의 역할 수행도 가능케 할 수 있을 것이다.

본 과제에 기술적인 배경을 보면 감귤식초 및 식초산 음료를 고품질의 상품으로 개발하기 위해서는 선행될 여러 가지 측면이 있다. 우선 감귤식초용 원주발효공정 체계 수립과 감귤이 보유한 높은 유기산 함량에도 발효가 가능한 균주선발, 제주의 주력생산 품종 중 식초발효에 적합한 품종선발, 고품질식초 생산을 위한 효율적인 발효방법 개발이 되어야 상큼한 맛의 천연식초 개발이 가능할 수 있다.

경제, 산업적 측면에서 보면 체계적으로 고품질의 제품을 생산할 수 있는 발효기법

개발에 의해 발효가공품이 대량 생산되어 감귤을 많이 소비 시킬 수 있는 기반이 조성되면 감귤 수급안정을 위한 조절기능이 가능해 질 수 있을 것이다. 더욱이 가공품 가격이 창출되어 고부가가치가 가능하여 농가소득 증대에도 지대한 공헌을 할 것으로 보여진다.

여기에 기능성 품목으로도 개발된다면 소비자의 건강식품에 대한 요구를 만족시켜주고 새로운 수요를 창출 시킬수도 있을 것이다.

3. 재료 및 방법

가. 연구재료 및 방법

식초용 원주에 적합한 품종선발을 위해 제주에서 가장 많이 생산되는 온주밀감중 극조생종으로는 '궁본조생온주', 조생종에는 '궁천조생온주', 만생종에는 '청도온주' 품종을 이용하였다. 품종별 발효력을 보기 위해 감귤을 착즙한 후 착즙원액에 sucrose를 가하여 당도를 23°brix로 조정 발효용 배지로 조성 한 후 여기에 제주농업시험장 개발 균주 CMY-28(Citrus Marmelo Yeast)을 접종하였다.

착즙방법별 생산된 주스가 원주발효에 적합하고 착즙 효율에 따른 경제성을 검토하기 위해 과실로는 '궁천조생온주' 품종을 이용하였다. 착즙방법으로 직접압착법은 vertical basket press(유압식), 회전착즙법은 스크루형 finisher, 연속식으로는 In-line extractor(FMC)를 이용하여 착즙한 후 착즙효율과 과즙품질을 검토하였다.

감귤주스에 근본적으로 함유되어 있는 산함량을 낮추는 방법에는 회석에 의한 방법이 가장 효율적으로 이용되고 있다. 본시험에서는 감귤 주스원액에 물의 회석정도를 달리하여 알콜 생성량을 조사 하였다. 시험 방법으로는 감귤 '궁천조생온주' 품종의 천연과즙과 농축과즙(복합가공공장 생산품: 6배농축액)으로 천연과즙처리하는 원액 100% 처리, 원액과즙 75%에 물 25% 가수, 원액과즙 50%에 물50%로 발효용 배지를 조성하였다. 농축과즙이용 시험은 제주복합가공공장에서 생산한 농축과즙을 이용하여 100%로 환원한 감귤과즙을 제조하였다. 이 제조된 과즙을 이용하여 100% 환원감귤 과즙액, 환원과즙 75%에 물 25% 가수, 환원과즙 50%에 물50%를 가수한 후 발효 배지로 사용하였다. 각기 조성된 배지에 sucrose를 이용하여 당도를 23°Bx로 조정하였다. 여기에 CMY-28(Citrus Marmelo Yeast)를 접종한 후 처리별 발효력을 검정하였다.

원주용 감귤과즙 품질기준을 설정하기 위한 시험재료는 농축주스와 감귤 '궁천조생'

의 신선과실 착즙액을 선정하였다. 선정된 쥬스의 당도조성별 품질을 검토하기 위해 당도를 10, 15, 20, 25 °Brix(가당재료 : Sucrose)로 조정한 후 각각 당농도 조성별 발효력 검토를 수행 하였다. 조사항목으로 유기산, 잔당 및 알콜생성량을 3일간격으로 분석 검토하였다.

CMY-28균주의 온도 및 종균 접종량별 발효특성 검토에서도 품질기준 설정시험과 같은 방법으로 시험재료를 농축쥬스와 신선과실 착즙액을 이용하였고 발효온도를 20, 25, 30 °C로 하고 종균 접종규모를 5, 10, 15 %한 후 3일간격으로 잔당, 유기산, 알콜 생성량 등을 조사 분석하였다.

나. 분석조건

원료과즙의 가용성고형물은 과즙을 Abbe굴절계(Attago, 일본)를 사용하여 측정하였다. 유기산 및 유리당 분석시료는 발효시기별 발효액의 상등액을 milipore filter(0.45 μ m)로 여과한 후 초순수를 사용하여 1,000배 희석하여 사용하였다. 유기산 분석은 Bio-LC(Dionex, DX-500, 미국)를 이용하였고 detectors는 ED 40 conductivity를 사용하고 column은 Ionpac® ICE-AS6 column을 사용하였으며, Injector에는 0.5 μ l를 주입하고 이동상은 0.4mM heptaflorobutyric acid로 유속을 0.9ml/min로 하였다. 표준물질로서는 L-malic, citric, oxalic acid(Sigma, GR)를 20ppm농도로 희석 혼합하여 측정하였다. 유리당 분석은 Bio-LC(Dionex, DX-500, 미국)를 이용하였고 detectors는 ED 40 INT amperometry를 사용하였다. column은 Carbopac™ PA1 column을 사용하였으며, 이동상은 100mM NaOH로 유속을 0.6ml/min로 하였고, Injector 주입량은 0.5 μ l를 기준하여 주입하였다. 유리당 정량을 위한 표준물질로서는 fructose, glucose, sucrose(Sigma, GR)를 20ppm농도로 희석 혼합하여 측정하였다.

4. 결과 및 고찰

감귤식초용 원주발효공정의 정립은 우수한 품질의 식초산 발효품 생산의 기본이라고 할 수 있다.

우수한 원주생산은 이를 이용한 제품의 생산수율을 높힐 수 있고 품질 또한 향상시킬 수 있기 때문에 새로운 맛의 천연 식초 개발을 이루기 위한 선행조건이다.

본과제의 기본목적인 감귤 수급안정에 기여를 하기 위해서는 현재 제주에서 가장 많이 생산되고있는 온주밀감 이용성 증진의 시급성을 고려하여 제주에서 가장 많이 생산되고있는 온주밀감 3품종을 공시하여 발효력을 검토한 결과 아래의 표 1에서와 같다. 온

주밀감 '궁천조생' 품종이 타처리 품종에 비해 가장 단기간에 알콜생성력이 높게 생성되었다. 또한 산의 소모에서도 타품종에 비해 '궁천조생' 품종이 가장 많이 소모되어 제주에서 생산되는 온주밀감 품종중에는 '궁천조생'이 식초용원주 재료로 가장 효율적인 것으로 검토되었다.

(표 1) 품종 및 숙기별 CMY-28균주이용 발효력검토(알콜생성량)

처 리	발효 2일 후		발효 6일 후		발효 10일 후	
	알콜생성량	적정산	알콜생성량	적정산	알콜생성량	적정산
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
극조생:궁본조생 (수확 : 10월상)	4.2	0.88	7.8	0.80	12.0	0.78
조생:궁천조생 (수확 : 11월하)	4.2	0.78	8.8	0.76	13.1	0.70
만생:청도온주 (수확 : 1월하)	2.8	0.95	5.4	0.92	9.0	0.90

* 발효용 원액조성 : Sucrose이용 23°Brix로 조정, 발효온도 15℃, 초기적정산 1.0%

착즙방법은 산업화로 가기 위한 가장 중요한 요소로 착즙수율은 곧 바로 가공량의 결정 및 경제성 설정의 기초가 된다. 감귤은 함수율이 높은 과실이지만 자체가 가지고 있는 당성분 및 셀룰로우스 등에 의해 수분 유지력이 강하여 착즙효율을 높이는 방법이 매우 중요하다. 감귤이 가지고 있는 구조적인 수분보유력을 극복하는 것도 중요한 요소이나 착즙시 고품질의 주스를 획득하는 것도 매우 중요하다. 착즙수율이 높고 품질도 우수한 착즙방법 설정은 본 시험의 첫단계로 극복해야할 중요한 요소이다.

본시험에서는 현재 제주지역에서 사용되고있는 모든 착즙방법을 이용하여 가장 감귤특성에 적합하고 효율적인 착즙방법을 검토하고자 수행하였다.

제주에서 사용되고있는 착즙기를 이용하여 착즙효율을 검토한 결과 표 2에서 보는 바와 같이 분쇄기를 이용해 과실을 파쇄한 후 Mono-yarn부직포에 넣어 압력을 가하여 착즙하는 방법인 직접압착법이 과즙율이 57.7%로 다른 방법보다 수율이 높아 경제

적인 면에서는 효율적이었으나 반면에 착즙시간은 제일 많이 소요되었다. 시간당 생산량은 스퀴르형 압착방법인 회전압착법이 시간당 114Kg이 착즙되어 가장 높았으나 스퀴르형 압착방법은 청징도가 직접압착법보다 우수하지 못하였다.

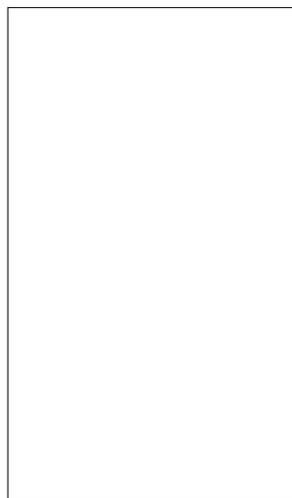
(표 2) 착즙방법에 따른 착즙율 검토

처 리	착즙율(%)	착즙시간(L/hr)	청징도
In-Line(FMC)	46.5	92	++ ^z
유압식압착형	57.8	49	+++
습식마쇄+Finisher	50.1	105	+

^z청징+++ , 보통++ , 혼탁+



(In-Line(FMC))



(유압식압착형)



(습식마쇄+Finisher)

(그림 1) 착즙기 형태별 실물 그림

원활한 발효에 의한 고품질의 원주를 제조하기 위해서는 우선 유기산의 농도를 적절히 조정해야 한다. 아무리 내산성 균주가 개발 되더라도 높은 유기산은 발효에 많은 장애가 되기 때문이다. 현재 유기산함량을 감소시키기 위해 가장 많이 이용되고 있는 방법은 원액에 물을 첨가하여 유기산농도를 낮추는 방법이다. 본 시험은 원주용 과즙제조시 희석농도배수 조정시험을 실시하였다. 시험결과 표 3에서와 같이 전체적으로 천연과즙처리구가 농축과즙처리구에 비해 발효가 빨리 일어났다.

천연과즙(생과착즙주스)처리는 희석농도에 따라 발효시기별 발효속도 차이가 뚜렷치 않았으나 농축과즙처리구에서 원액(100% 환원 주스)처리는 초기발효가 희석처리들에 비해 발효가 빠르게 일어난 것을 확인하였다.

(표 3) 원주용 과즙제조 방법의 표준화를 위한 희석배수 조정시 알콜생성량
(단위 : %)

처리	희석배수	발효 4일	발효 8일	발효 12일
	원 액	11.8	13.0	13.6
천연과즙	과즙75 : 물25	10.6	12.5	13.5
	과즙50 : 물50	8.5	10.1	13.5
농축과즙 (100%로 환원 ^Z)	원 액	8.8	10.3	12.6
	과즙75 : 물25	7.1	8.7	11.2
	과즙50 : 물50	6.5	7.1	10.4

* 발효용 원액조성 : 희석 후 Sucrose이용 23°Brix로 조정

^Z 6배농축 과즙을 6배의 물을 가하여 100% 주스로 환원 시킴

신선과즙에 sucrose를 첨가하여 과즙의 당도를 조정한 원액에 효모를 접종하여 시기별 발효효율을 검토하였다. 처리별 당도 잔류여부를 분석한 결과로 발효속도를 보면 당도조성이 높은 처리구 일수록 발효시기가 지연되는 결과를 나타내었다. 특히 당도조성이 10, 15 °Brix로 조정한 처리구에서는 처리후 3일만에 1차발효가 급격히 완료된 반면에 20, 25 °Brix 처리구에서는 6일차에 이르러서야 1차발효가 완료되기 시작하는 경향을 보였다. 처리별 적정산도 측정결과 처리구 모두 발효 시기가 진행되어도 산의 감소가 적었다. 초산발효와는 달리 원주발효는 정치배양을 하기 때문에 발효시험기적 상태가 유지되어 이로 인한 결과로 보여진다. 저당도(低糖度)당도조성 처리구 일수록 발효시기가 경과되어도 산의 감소가 완만하였다. 휘발산은 처리, 시기별 차이가 없었다.

(표 4) 신선과즙 당도 조성에 따른 시기별 발효 효율

조성당도 (°Brix)	조사항목	조 사 일 (일)			
		3	6	9	12
10	당 도(°Bx)	4.82	4.12	4.00	3.98
	산함량(%)*	1.00	0.97	0.98	0.97
	휘발산(%)	0.01	0.01	0.01	0.01
15	당 도(°Bx)	5.00	5.00	5.00	5.00
	산함량(%)	0.87	0.85	0.87	0.85
	휘발산(%)	0.01	0.01	0.01	0.01
20	당 도(°Bx)	9.00	6.40	6.40	6.40
	산함량(%)	0.91	0.88	0.90	0.89
	휘발산(%)	0.01	0.01	0.01	0.01
25	당 도(°Bx)	14.0	9.80	8.20	8.00
	산함량(%)	0.88	0.88	0.91	0.91
	휘발산(%)	0.01	0.01	0.01	0.02

*0.1N NaOH로 적정 후 Citric acid로 환산, 균주접종량 : 원액 총량의 10%
초기원액 산함량(당도 10°Bx 기준) : 1.0%

표 5에서와 같이 농축과즙 당도조성처리에 따른 발효효율 검토 결과 신선과 과즙과는 달리 발효 시점이 당도의 함량에 관여되지 않는 경향을 보였다. 대부분 모든 처리구가 처리 3일만에 발효가 급격히 진행되었다. 이러한 원인은 주스농축과정에서 수행되는 열처리에 의해 발효간섭물질이 감소된 결과로 사료되며 차 후 이에 대한 정밀한 검토가 요구된다. 발효의 진전에 따라 처리별 산함량이 감소되는 차이는 신선과즙과는 달리 저당도(低糖度)처리에서는 발효시기가 경과되어도 산이 높게 유지되는 경향이었다. 또한 발효 후기로 진행 될 수록 당도의 변화가 일정한 경향으로 변화되지 않는 상태를 보였는데 이에 대한 원인을 여러 가지 요인들로 검토해 본 결과 시료 측정방법이 용액의 가용성 고형물을 굴절당도계를 이용하여 측정하는 방법을 선택한 결과로 시료가 발효과정을 거치면서 측정시료가 불안정한 상태에서 측정되었던 것으로 사료되었다.

(표 5) 농축과즙 당도 조성에 따른 시기별 발효 효율

조성당도 (°Brix)	조사항목	조 사 일 (일)			
		3	6	9	12
10	당 도(°Bx)	4.00	4.00	3.90	3.80
	산함량(%)*	0.83	0.79	0.79	0.61
	휘발산(%)	0.01	0.01	0.01	0.05
15	당 도(°Bx)	6.00	5.80	5.80	6.00
	산함량(%)	1.22	1.17	1.22	1.17
	휘발산(%)	0.01	0.01	0.01	0.01
20	당 도(°Bx)	8.00	7.80	7.60	8.00
	산함량(%)	1.60	1.53	1.55	1.51
	휘발산(%)	0.01	0.01	0.01	0.01
25	당 도(°Bx)	10.0	10.0	9.80	10.0
	산함량(%)	2.10	1.91	1.93	1.92
	휘발산(%)	0.02	0.02	0.02	0.02

*0.1N NaOH로 적정 후 Citric acid로 환산, 균주접종량 : 원액 총량의 10%
초기원액 산함량(당도 10°Bx 기준) : 1.0%

원주 발효공정의 정립은 식초 및 식초산음료를 산업화로 이끌기 위한 기본이므로 이에 대한 연구는 매우 중요하다. 원주 발효공정의 정립을 위한 첫 번째 단계는 발효 기간단축이다. 일정규모를 갖춘 생산공장에서 발효기간의 단축은 시설을 효율적으로 이용할 수 있으며 특히 생산량과 직결되기 때문에 발효법 정립에 의한 발효기간 설정은 매우 중요하다.

본 시험은 단기간에 초산발효용 고품질의 원주생산을 위한 방법을 규명하기 위해 발효기간에 가장 많은 영향을 줄 수 있는 온도, 효모접종량, 발효원 당도조성 등을 설정하여 시험을 실시 하였다. 모든 시험처리구에서 사용된 발효용 효모는 제주농업시험장에서 분리한 CMY-28을 이용하였고, 당도조성은 6년간 제주농업시험장에서 시험한 결과로 획득한 가장 효율이 높은 당도 급원인 sucrose를 이용하였다. 시험결과 발효조별 각기 다른 발효온도(20, 25, 30℃), 효모접종량(5, 10, 15%) 및 발효원 당도조성(10, 15, 20, 25° Brix)을 설정한 후 발효속도별 원주의 특성을 검토한 결과는 아래와 같다.

온도처리 20℃에서 우선 첫 번째로 검토한 분석결과로 발효과즙의 유기산(citric acid)성분의 변화는 이미 위에서 부언한 바와 같이 발효의 효율을 검토해 볼 수 있는 좋은 인자이다. 표 6에서 보는 바와 같이 접종량에 따른 유기산의 변화는 전체적으로 뚜렷한 차이는 없었으나 10% 접종량에서 농축액처리의 당도 10 °brix처리구가 접종 후 21일에서 초기함량 반 이상의 효율적인 유기산 소모량을 보였다. 본 시험결과 산함량 검토에서는 원주제조시 효모의 접종량을 많이 한다고 하더라도 발효효율이 증가되지 않는 결과를 얻었다.

발효 후 원주에 잔류되어있는 당성분은 발효효모의 발효능력을 검토할 수 있는 매우 중요한 요소로 볼 수 있다. 발효온도 20℃에서 발효시기별 잔당의 함량을 검토해 본 결과 표 7에서와 같이 유기산의 함량과 마찬가지로 접종량 처리에 따른 잔당의 함량은 차이를 볼 수 없었고 발효시간에 있어서는 접종량 10%처리 대부분이 발효초기 당의 소모 효율이 높았다.

알코올의 함량은 원주발효의 생산효율을 판단할 수 있는 기본이므로 가장 중요한 인자이다. 발효온도 20℃에서 발효 시기별 알코올 생성량을 기준으로 검토해 보면 접종량별 효율성은 농축액 처리에서는 저당도 처리(15 °brix 이하)의 15%를 접종한 처리가 가장 효율적이었으며 20°brix 이상에서는 10% 접종처리가 효율적이었다. 신선과즙의 당도조성 처리에서도 저당도 처리(15 °brix 이하)의 15%접종 처리가 가장 효율적 있었고 20°brix 이상에서는 10% 접종처리가 효율적이었다(표 8).

(표 6) 발효 20℃에서의 균주 접종량별 발효 시기별 유기산(Citric acid)

(접종량 : 5%)

	당도조성 (°Brix)	Citric acid ^z (%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농 축 액	10	0.90	0.90	0.84	0.84	0.81	0.78	0.67	0.62	0.52	0.46	0.46
	15	1.28	1.28	1.22	1.22	1.20	1.15	1.07	1.05	1.02	0.91	0.80
	20	1.66	1.66	1.61	1.61	1.57	1.57	1.57	1.57	1.56	1.55	1.55
	25	2.21	2.21	2.08	2.08	2.04	2.04	2.04	2.03	2.03	2.00	2.00
착 즙 액	10	0.79	0.79	0.78	0.78	0.76	0.76	0.76	0.75	0.75	0.74	0.74
	15	0.94	0.94	0.94	0.94	0.91	0.91	0.91	0.91	0.90	0.90	0.90
	20	1.00	1.00	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.91	0.90	0.90	0.90
	25	0.89	0.89	0.89	0.88	0.88	0.86	0.85	0.85	0.84	0.84	0.82

(접종량 : 10%)

	당도조성 (°Brix)	Citric acid ^z (%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농 축 액	10	0.89	0.89	0.85	0.83	0.77	0.61	0.48	0.48	0.47	0.44	0.40
	15	1.27	1.27	1.20	1.18	1.18	1.11	1.02	1.00	0.95	0.85	0.77
	20	1.64	1.64	1.54	1.53	1.53	1.50	1.50	1.50	1.50	1.47	1.41
	25	2.08	2.08	1.97	1.97	1.94	1.94	1.93	1.93	1.90	1.90	1.90
착 즙 액	10	0.78	0.78	0.78	0.78	0.76	0.74	0.70	0.70	0.69	0.65	0.51
	15	0.92	0.92	0.89	0.89	0.88	0.88	0.88	0.87	0.87	0.86	0.85
	20	0.98	0.98	0.93	0.92	0.91	0.89	0.89	0.89	0.88	0.87	0.87
	25	0.89	0.89	0.88	0.88	0.85	0.85	0.85	0.85	0.82	0.82	0.80

(접종량 : 15%)

	당도조성 (°Brix)	Citric acid ^z (%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농 축 액	10	0.91	0.91	0.88	0.88	0.86	0.86	0.86	0.85	0.83	0.47	0.47
	15	1.23	1.23	1.19	1.19	1.16	1.17	1.21	1.16	1.16	1.01	0.84
	20	1.55	1.55	1.54	1.54	1.54	1.54	1.53	1.53	1.540	1.42	1.36
	25	2.10	2.10	1.94	1.94	1.94	1.92	1.92	1.92	1.90	1.90	1.90
착 즙 액	10	0.76	0.76	0.75	0.75	0.75	0.75	0.74	0.74	0.74	0.73	0.73
	15	0.94	0.94	0.91	0.91	0.88	0.87	0.87	0.87	0.86	0.59	0.50
	20	1.02	1.02	0.91	0.91	0.90	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.87
	25	0.95	0.95	0.85	0.85	0.82	0.82	0.82	0.82	0.80	0.80	0.80

*조사간격 (시작일 2002. 8.24) ^z organic acid

(표 7) 발효 20℃에서의 균주 접종량별 발효 시기별 당도

(접종량 : 5%)

당도조성 (°Brix)	가용성고형물(° Brix)											
	3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	
농 축 액	10	4.2	4.2	4.2	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.8	3.6	3.5
	15	6.1	6.1	6.1	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	5.9	5.6
	20	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2	8.0	8.0	8.0	8.0
	25	11.3	11.3	10.8	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	10.5	10.4
착 즙 액	10	4.0	4.0	4.0	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.5
	15	5.3	5.3	5.3	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.0	5.0
	20	6.9	6.9	6.9	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4
	25	11.4	11.4	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2	8.0	8.0	7.6	7.6

(접종량 : 10%)

당도조성	가용성고형물(° Brix)											
	3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	
농 축 액	10	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.8	3.8	3.6	3.6
	15	6.2	6.2	6.8	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	5.5	5.5
	20	7.8	7.8	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.2
	25	10.3	10.3	10.2	10.2	10.2	10.2	10.2	10.2	10.2	10.0	9.5
착 즙 액	10	3.7	3.7	3.7	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.5
	15	5.5	5.5	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.6	4.6
	20	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
	25	10.4	10.4	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	7.8	7.8	7.2	7.2

(접종량 : 15%)

당도조성 (°Brix)	가용성고형물(° Brix)											
	3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	
농 축 액	10	4.1	4.1	4.1	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.5	3.4
	15	6.2	6.2	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	5.8	5.6	5.6
	20	7.9	7.9	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.6
	25	10.6	10.6	10.6	10.4	10.4	10.4	10.0	10.0	10.0	9.4	9.4
착 즙 액	10	3.7	3.7	3.7	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.9
	15	7.6	7.6	5.2	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.1	4.1
	20	7.0	7.0	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.5	6.0	6.0	6.0
	25	12.5	12.5	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.0	7.0	7.0

*조사간격 (시작일2002. 8.24)

(표 8) 발효온도 20℃에서의 균주 접종량별 발효 시기별 알코올

(접종량 : 5%)

	당도조성 (°Brix)	알코올(%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농 축 액	10	4.0	4.0	4.6	4.7	4.8	5.0	5.2	5.4	5.0	3.6	2.4
	15	6.2	6.2	6.7	7.2	7.2	7.4	7.5	7.9	7.2	6.6	6.2
	20	7.0	7.8	9.6	9.6	9.6	9.7	9.0	10.0	10.2	10.4	9.8
	25	6.2	6.8	11.4	11.4	11.8	12.4	13.0	13.3	13.4	10.8	12.2
찰 즙 액	10	3.6	3.8	4.4	4.8	5.0	5.2	5.0	4.8	4.0	4.2	3.6
	15	5.0	5.1	8.0	8.0	8.2	8.4	8.1	7.5	6.8	6.6	7.8
	20	6.4	6.7	7.4	9.0	10.6	11.6	11.6	11.6	10.0	10.2	12.0
	25	8.4	8.6	14.4	15.4	15.4	16.2	16.2	16.3	16.8	16.0	14.8

(접종량 : 10%)

	당도조성	알코올(%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농 축 액	10	3.6	3.8	4.0	4.2	4.4	4.6	4.7	4.2	4.1	4.0	4.0
	15	5.2	5.4	5.6	6.2	7.0	7.4	7.4	7.0	7.4	7.0	6.8
	20	7.4	7.5	8.6	8.6	9.2	9.4	9.5	9.6	9.8	10.0	9.0
	25	8.2	8.6	9.6	12.4	11.2	12.4	12.4	12.6	12.8	12.9	11.4
찰 즙 액	10	3.4	3.6	4.0	4.4	4.4	4.8	4.8	4.2	3.8	3.8	3.8
	15	4.4	4.6	7.4	7.4	7.6	8.4	8.4	7.8	6.0	6.0	5.4
	20	5.8	6.1	9.2	10.4	11.2	11.4	11.4	11.6	8.8	8.8	8.4
	25	7.2	7.5	10.0	10.4	12.0	12.8	14.0	14.0	14.2	14.8	14.8

(접종량 : 15%)

	당도조성	알코올(%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농 축 액	10	5.2	5.4	5.6	5.8	5.8	5.8	5.4	5.4	5.4	4.6	4.2
	15	7.0	7.1	7.2	7.6	7.6	7.6	7.8	7.9	7.8	7.2	6.8
	20	8.4	8.6	9.2	9.0	9.2	10.0	10.0	10.0	10.2	9.0	9.2
	25	10.4	10.7	11.0	11.4	11.8	11.9	12.2	12.2	12.4	12.4	12.8
찰 즙 액	10	4.2	4.6	4.7	5.0	5.1	5.2	5.2	5.0	5.0	4.4	4.4
	15	7.0	7.3	8.2	8.2	8.4	8.4	8.0	8.0	8.0	7.0	6.4
	20	8.1	8.5	9.3	10.0	11.0	11.2	11.3	11.4	11.4	10.9	9.4
	25	10.6	10.6	12.7	13.4	14.2	14.9	14.9	14.9	15.0	14.6	14.6

*조사간격 (시작일2002. 8.24)

발효온도 25℃에서의 균주 접종량별 발효 시기별 유기산의 함량을 검토해 본 결과 표 9에서 보는 결과와 같이 유기산의 변화는 접종량 별 뚜렷한 차이는 없었으나 접종량 15% 처리의 농축액, 신선과실 착즙액 처리가 산의 소모가 조기에 이루어진 것을 알 수 있었다.

표 10에서와 같이 균주 접종량별 발효시기별 당도의 함량을 검토해 본 결과 유기산의 함량과 마찬가지로 접종량 처리에 따른 잔당의 함량은 차이를 볼 수 없었다. 당도 함량을 기준으로 한 발효시간 검토에서는 접종량 15%처리가 발효초기에 당의 소모효율이 높았다.

균주 접종량별 발효 시기별 알콜함량을 검토해 본 결과 농축액 처리에서는 접종량에 따른 명쾌한 효과를 확인 할 수 없었다. 그러나 처리중 5% 접종처리에서의 당도조성 처리구 모두 타 접종량 처리구에 비해 알콜 생성량이 높은 경향을 나타내었다. 신선과실 착즙액처리에서도 농축액 처리와 마찬가지로 5%접종 처리가 알콜 생성량이 높은 경향이였다(표 11).

(표 9) 발효온도 25℃에서의 균주 접종량별 발효 시기별 유기산(citric acid)함량
(접종량 : 5%)

당도조성		Citric acid ^z (%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농	10	0.82	0.82	0.78	0.75	0.63	0.49	0.48	0.48	0.48	0.48	0.47
	15	1.28	1.26	1.26	1.21	1.22	1.21	1.14	1.14	1.10	1.08	1.07
	20	1.67	1.67	1.63	1.63	1.63	1.61	1.61	1.61	1.55	1.55	1.55
	25	2.19	2.10	2.06	2.06	2.06	2.06	2.01	2.01	2.01	2.01	2.00
착	10	0.99	0.98	0.98	0.95	0.84	0.56	0.49	0.49	0.47	0.49	0.47
	15	1.00	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.94	0.94	0.93
	20	1.04	1.04	1.03	1.03	1.03	1.00	0.99	0.98	0.96	0.96	0.96
	25	1.02	1.02	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.97	0.97	0.97

(접종량 : 10%)

당도조성		Citric acid ^z (%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농	10	0.83	0.81	0.76	0.70	0.63	0.51	0.51	0.51	0.45	0.45	0.45
	15	1.24	1.22	1.21	1.18	1.12	1.12	1.10	1.07	1.04	1.02	1.02
	20	1.64	1.61	1.60	1.60	1.58	1.58	1.58	1.58	1.50	1.50	1.50
	25	2.17	2.01	2.00	2.00	1.98	1.98	1.90	1.90	1.88	1.88	1.85
착	10	0.98	0.96	0.95	0.91	0.76	0.51	0.51	0.51	0.50	0.50	0.50
	15	1.00	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.96	0.95	0.94	0.93	0.93
	20	1.00	1.00	0.97	0.97	0.97	0.97	0.95	0.95	0.93	0.92	0.92
	25	1.01	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00	0.95	0.95	0.95	0.95	0.94

(접종량 : 15%)

당도조성		Citric acid ^z (%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농	10	0.84	0.80	0.77	0.71	0.57	0.52	0.44	0.44	0.44	0.44	0.43
	15	1.20	1.19	1.14	1.11	1.03	1.03	0.74	0.74	0.58	0.58	0.58
	20	1.58	1.54	1.54	1.54	1.54	1.54	1.50	1.50	1.50	1.46	1.46
	25	1.93	1.92	1.92	1.90	1.90	1.86	1.86	1.86	1.85	1.85	1.85
착	10	0.96	0.96	0.96	0.91	0.77	0.55	0.50	0.46	0.46	0.46	0.45
	15	0.96	0.95	0.94	0.94	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.91	0.91
	20	1.00	0.97	0.97	0.97	0.96	0.96	0.95	0.93	0.92	0.92	0.92
	25	1.00	1.00	0.98	0.97	0.97	0.97	0.96	0.95	0.92	0.92	0.92

*조사간격 (시작일 : 2003. 3. 11) ^zorganic acid

(표 10) 발효온도 25℃에서의 균주 접종량별 발효 시기별 당도

(접종량 : 5%)

당도조성		가용성고형물(° Brix)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농	10	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
	15	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
	20	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.4	8.4	8.4
	25	12.4	11.6	11.6	11.6	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0
착	10	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.8	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
	15	6.0	6.0	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
	20	9.8	7.8	7.8	7.8	7.0	7.0	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
	25	10.0	9.0	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.4

(접종량 : 10%)

당도조성		가용성고형물(° Brix)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농	10	4.0	4.0	4.0	3.8	3.8	3.8	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
	15	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
	20	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.2
	25	12.4	11.2	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8	10.6	10.6	10.6
착	10	4.0	4.0	4.0	3.8	3.8	3.8	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
	15	6.0	6.0	6.0	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
	20	9.4	7.2	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.6	6.6
	25	14.6	9.6	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.2

(접종량 : 15%)

당도조성		가용성고형물(° Brix)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농	10	4.0	4.0	4.0	3.8	3.8	3.8	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
	15	6.0	6.0	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.4
	20	8.4	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
	25	12.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.0
착	10	4.0	4.0	4.0	3.8	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
	15	6.0	6.0	5.4	5.2	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	20	8.2	6.8	6.4	6.4	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
	25	13.6	9.0	8.0	8.2	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8

* 조사간격 (시작일 : 2003. 3. 11)

(표 11) 발효온도 25℃에서의 균주 접종량별 발효 시기별 알콜함량

(접종량 : 5%)

당도조성		알코올(%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농	10	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.2	4.2	4.2
	15	6.4	6.4	6.4	6.5	6.5	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	7.0
	20	8.2	9.4	9.4	9.4	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	10.0
	25	10.0	12.0	12.8	15.2	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
착	10	4.2	4.2	4.2	4.4	4.2	3.8	3.8	3.8	3.8	3.6	4.6
	15	7.2	7.2	7.4	7.4	7.4	7.4	7.6	7.8	7.8	7.8	8.0
	20	8.8	10.8	11.0	11.5	11.5	11.6	11.6	11.6	11.6	11.7	11.7
	25	8.8	14.0	14.0	14.0	14.4	14.4	14.6	15.0	15.2	15.6	15.8

(접종량 : 10%)

당도조성		알코올(%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농	10	3.8	4.0	4.2	4.2	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
	15	6.0	6.0	6.2	6.3	6.4	6.5	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
	20	8.6	9.4	9.4	9.5	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.8	9.8
	25	9.4	10.0	11.0	11.2	11.4	11.4	11.4	11.4	11.4	11.6	11.5
착	10	4.0	4.0	4.2	4.2	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.6	3.6
	15	6.2	6.3	7.0	7.4	7.8	7.4	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
	20	8.4	10.0	10.0	10.4	11.2	11.2	11.3	11.2	10.8	10.6	10.6
	25	8.6	13.4	13.6	14.0	15.0	14.0	13.6	13.4	13.2	13.2	13.2

(접종량 : 15%)

당도조성		알콜(%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농	10	3.0	3.0	3.2	4.0	4.0	3.8	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
	15	6.0	6.0	7.2	7.2	6.8	6.2	5.8	5.8	5.8	5.6	5.6
	20	7.0	7.0	7.6	8.8	8.8	8.4	7.2	7.2	7.2	7.6	7.4
	25	9.6	10.2	10.2	10.4	10.4	10.6	10.6	10.6	10.4	10.4	10.2
착	10	4.0	4.0	4.2	4.2	4.8	4.8	5.2	5.2	4.7	4.6	4.3
	15	6.2	6.2	6.8	7.2	7.2	7.8	8.0	8.0	7.6	7.6	7.5
	20	7.0	9.8	12.2	12.0	10.0	10.0	9.8	9.8	9.8	9.8	9.7
	25	8.0	13.0	14.3	14.3	14.1	14.6	14.8	14.6	14.6	14.3	14.0

*조사간격일(시작일 : 2003. 3. 11)

발효온도 30℃에서의 균주 접종량별 발효 시기별 유기산의 소모량은 접종량 10%처리
가 농축액, 당도조성처리 모두 산의 소모가 많았다.(표 12)

균주 접종량별 발효 시기별 당도의 함량은 접종량별, 처리별 모두 뚜렷한 차이를 볼
수 없었다.(표 13)

전체처리 발효온도 30℃에서의 균주 접종량별 발효 시기별 알콜함량이 발효 조기에
높은 경향을 보여 온도처리에서는 발효온도가 높을수록 발효가 빨리 일어남을 알 수
있었다. 본 시험결과 발효온도가 높을수록 신선착즙액의 발효효율이 높음을 표 13에
서 확인할 수 있었고 접종량에 따른 발효 속도는 뚜렷한 차이를 볼 수 없었다.(표 14)

(표 12) 발효온도 30℃에서의 균주 접종량별 발효 시기별 citric acid

(접종량 :5%)

당도조성	Citric acid ^z (%)											
	3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	
농	10	0.87	0.87	0.76	0.59	0.51	0.50	0.42	0.42	0.40	0.40	0.40
축	15	1.25	1.24	1.24	1.22	1.22	1.20	1.20	1.18	1.13	1.11	1.11
액	20	1.68	1.66	1.64	1.63	1.63	1.63	1.63	1.55	1.55	1.55	1.55
	25	2.07	2.07	2.06	2.06	2.06	2.05	2.00	1.96	1.96	1.94	1.94
착	10	0.98	0.98	0.96	0.96	0.95	0.89	0.80	0.67	0.61	0.59	0.57
즙	15	1.01	1.00	0.98	0.98	0.98	0.95	0.95	0.95	0.94	0.94	0.94
액	20	1.02	0.99	0.99	0.99	0.98	0.98	0.98	0.94	0.94	0.93	0.93
	25	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.95	0.95	0.93	0.93	0.93

(접종량 : 10%)

당도조성	Citric acid ^z (%)											
	3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	
농	10	0.84	0.82	0.72	0.60	0.52	0.47	0.45	0.40	0.40	0.40	0.40
축	15	1.23	1.21	1.18	1.17	1.17	1.17	1.10	1.08	1.08	1.07	1.07
액	20	1.63	1.63	1.59	1.59	1.59	1.59	1.55	1.54	1.50	1.48	1.48
	25	2.11	2.00	2.00	2.00	2.00	1.97	1.92	1.87	1.86	1.86	1.86
착	10	0.96	0.94	0.94	0.85	0.85	0.46	0.46	0.46	0.46	0.45	0.45
즙	15	0.97	0.96	0.94	0.94	0.94	0.94	0.93	0.91	0.92	0.90	0.90
액	20	1.00	0.99	0.96	0.96	0.96	0.96	0.94	0.94	0.94	0.93	0.93
	25	1.00	1.00	0.96	0.96	0.96	0.96	0.95	0.95	0.95	0.92	0.92

*조사간격 (시작일 : 2003. 3. 11) ^zcitric acid로 환산

표 13) 발효온도 30℃에서의 균주 접종량별 발효 시기별 당도
(접종량 : 5%)

당도조성	가용성고형물(° Brix)											
	3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	
농 축 액	10	4.0	4.0	4.0	3.8	3.8	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
	15	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
	20	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6
	25	12.4	11.2	11.2	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0
착 즙 액	10	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
	15	6.0	6.0	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
	20	7.4	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
	25	12.8	9.0	9.8	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6

(접종량 : 10%)

당도조성	가용성고형물(° Brix)											
	3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	
농 축 액	10	4.0	4.0	4.0	3.8	3.8	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
	15	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
	20	8.6	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2
	25	11.2	10.8	10.8	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6
착 즙 액	10	4.0	4.0	4.0	4.0	3.8	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
	15	6.0	6.0	5.4	5.4	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.0
	20	7.2	6.8	6.8	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6
	25	11.2	8.6	8.6	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4

* 조사간격 (시작일 : 2003. 3. 11)

(표 14) 발효온도 30℃에서의 균주 접종량별 발효 시기별 알콜함량
(접종량 : 5%)

당도조성		알코올(%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농 축 액	10	4.2	4.2	4.4	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
	15	7.2	7.2	7.5	7.5	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6
	20	9.4	9.6	9.8	9.6	9.2	9.2	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
	25	10.4	11.8	11.8	11.8	11.2	11.2	11.2	11.2	11.0	11.0	11.0
착 즙 액	10	4.0	4.0	4.2	4.2	4.2	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
	15	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.6	7.8	7.8	7.8
	20	10.2	10.2	10.6	11.2	11.2	11.2	11.2	11.2	11.2	10.8	10.6
	25	10.6	14.0	14.9	15.0	14.8	14.4	14.2	14.2	14.2	14.2	14.2

(접종량 : 10%)

당도조성		알코올(%)										
		3*	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
농 축 액	10	4.0	4.2	4.3	3.8	3.8	3.8	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
	15	6.6	6.6	6.8	6.8	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4
	20	9.2	9.2	9.9	9.8	9.8	9.8	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
	25	10.2	10.2	10.8	11.2	11.2	11.4	11.2	11.2	11.2	11.2	11.2
착 즙 액	10	4.0	4.2	4.2	3.8	3.8	3.8	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
	15	7.0	7.0	7.4	7.5	7.5	7.5	7.5	7.4	7.4	7.4	7.0
	20	9.0	9.7	9.7	9.8	10.2	10.4	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	25	10.4	13.2	13.7	13.8	13.8	13.8	13.4	13.4	13.4	13.4	13.4

*조사간격일(시작일 : 2003. 3. 11)

당 종류별 이용성을 검토하기 위해 HPLC를 이용하여 분석해 본 결과 초기 발효에 의해 대부분 유리당은 소모하고 있음을 대부분 처리후 21일에서 유리당의 소모가 완료됨을 알았고(표 15), 발효온도 30℃에서는 신선과즙의 착즙액의 당 소모가 농축액에 비해 많았다(표 16).

(표 15) 발효온도 25℃에서의 성분변화
(균주량 : 5%)

당도조성		Glucose(%)		
		3/11	3/31	6/26
농축액	10	0.02	0.01	0.01
	15	0.03	0.02	0.01
	20	0.06	0.04	0.02
	25	0.62	0.04	0.06
착즙액	10	0.03	0.01	0.02
	15	0.18	0.02	0.02
	20	0.70	0.02	0.03
	25	0.73	0.03	0.05

당도조성		Fructose(%)		
		3/11	3/31	6/26
농축액	10	0	0	0
	15	0.01	0	0
	20	0.04	0.02	0.02
	25	0.89	0.03	0.04
착즙액	10	0.01	0	0
	15	0.23	0	0.01
	20	1.05	0	0.01
	25	1.05	0.03	0.05

당도조성		Sucrose(%)		
		3/11	3/31	6/26
농축액	10	0.16	0.10	0
	15	0.24	0.17	0
	20	0.37	0.27	0.28
	25	0.72	0.36	0.38
착즙액	10	0.06	0.05	0.01
	15	0.31	0.02	0.04
	20	1.36	0.02	0.04
	25	1.28	0.05	0.07

* 효모 접종량 10%

(표 16) 발효온도 30℃에서의 성분변화
(균주량 : 5%)

당도조성		Glucose(%)		
		3/11	3/31	6/26
농축액	15	0.06	0.02	0.03
착즙액	15	0.05	0.02	0.01

당도조성		Fructose(%)		
		3/11	3/31	6/26
농축액	15	0.07	0.01	0.01
착즙액	15	0.06	0	0

당도조성		Sucrose(%)		
		3/11	3/31	6/26
농축액	15	0.28	0.18	0.05
착즙액	15	0.08	0.02	0.01

* 효모 접종량 10%, 발효온도 25℃ 기준

4. 참고문헌

- A.O.A.C. 1990. "Official Methods of Analysis". 15th ed. Association Analytical Chemists, Washington, D.C. pp. 914-915.
- Beaudry, E.G. and K.A. Lami, 1990. Membrane technology for direct osmosis concentration of fruit juices, Food Tech., 44(6), 121.
- Braddock, R.J. and K.R. Cadwallader, 1992. New processing techniques and isolation procedures allow for more efficient utilization of traditional citrus by-products, Food Tech., 46(2), 105-110.
- C.S.Ough. 1988. Methods for Analysis of Musts and Wines. California Univ.
- David, W. B., Anal. Chem, 38, 726(1966).
- Eun-Young Song, Young-Hun Choi, Kyung-Hee Kang, Jeong-Sam Koh, Quality characteristics of citrus fruits according to the harvest date and variety, Agricultural Chemistry and Biotechnology, 40(5), pp 416-421(1997).
- Eun-Young Song, Young-Hun Choi, Kyung-Hee Kang and Jeong-Sam Koh, Free

- sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of cheju citrus fruits according to harvest date, Korean J. Food Sci. Technol., 30(2), pp 306-312(1998).
- Gun-Jo Woo and Seung-Mi Ha, Debittering of citrus products using β -cyclodextrin polymer and Ultrafiltration process. Korean J. Food Sci. Technol., 29(2), pp 302-308(1997).
- Gun-Jo Woo, Jin Nam and Jong-Bang Eun, Optimization of membrane separation process for the production of dietary fibers from tangerine peels, Korean J. Food Sci. Technol., 28(2), pp 378-383(1996).
- Ting, S. V., Rouseff, R. L., Dougherty, M. H. and Attaway, J. A., Determination of some methoxylated flavones in citrus juices by high performance liquid chromatography, J. Food Sci., 44, 69(1986).
- Hyun-Yu Lee, Ho-Moon Seog, Young-Jung Nam and Dong-Hyo Chung, Physico-chemical properties of Korean mandarin(*Citrus reticula*) orange juices, Korean J. Food Sci. Technol., 19(4), pp 338-345(1987).
- Jeong-sam Koh and Seong-Hak Kim, Physiochemical properties and chemical composition of citrus fruits produced in cheju, Agricultural Chemistry and Biotechnology, 38(6), pp 541-545(1995).
- Jeong-sam Koh, Jeong-Eun Koh, Sang-Ho Yang and Sung-Ung Ahn, Physiochemical properties and sensory evaluation of *Citrus unshin* produced in cheju, Agricultural Chemistry and Biotechnology, 37(3), pp 161-167(1994).
- Jong-Bang Eun, Young-Min Jung and Gun-Jo Woo, Identification and determination of dietary fibers flavonoids in pulp and peel of korean tangerine(*Citrus aurantium var.*), Korean J. Food Sci. Technol., 28(2), pp 371-377(1996).
- Richard P.Vine. 1981. Commercial Wine Making. Mississippi State Univ.
- Young-Hwan Ko and Se Jae Kim, Collection and identification of molds from citrus oranges during post-harvest storage, Korean J. Food Sci. Technol., 28(6), pp 1142-1145(1996).
- 井上雅資, 岡田武孝, 科工, 43, 642(1969).
- 日本農林水産技術會議事務局, 1983. 温州みかん果汁の風味成分の解明とめに基づく品質

- 改善技術の確立, pp. 160.
- 伊福靖, 前田久夫, 1975. 温州ミカン果汁の品質改善と果皮利用に関する研究, 日本食品工業學會誌, 22(5), 19-24.
- 荒木忠治, 1992a. 温州ミカンの果汁加工適性, 特に化學的成分と果汁品質との關係(I), 日本食品工業學會誌, 39(5), 457-463.
- 荒木忠治, 1992b. 温州ミカンの果汁加工適性, 特に化學的成分と果汁品質との關係(II), 日本食品工業學會誌, 39(6), 555-563.
- 강경희. 1997. 제주감귤 가공산업의 현황과 문제점. 감귤 가공산업 육성을 위한 심포지엄. 제주감귤연구소.
- 고정삼, 고남권, 강순선. 1989. 제주도산 감귤발효주의 양조특성. 한국농화학회지 32(4), 416-423
- 고정삼, 강영주, 1994. 제주농업과 감귤가공산업, 광일문화사, pp. 110-111.
- 김승화, 문덕영, 김두섭, 김용배, 고정삼. 1987. 감귤발효주 제조에 관한 기초 연구.
- 김준철. 1994. 국제화시대의 양주상식. 노문사.
- 농협중앙회.1998. '98년산 감귤유통처리분석. 농협중앙.
- 이철호, 최주규,이진권. 1982. 식품공업 품질관리론. 유림문화사. 118-176

제 2 절 고품질 감귤 식용겔 개발

1. 감귤과즙의 사양

가. 재료 및 방법

1) 감귤과즙

제주개발공사에서 제조한 농축 감귤과즙(이하 과즙으로 약함)을 구입하여 증류수로 6배 또는 100배 희석하여 사용하였다. 6배 희석시에는 희석액을 그대로 배지로 사용하였으며, 100배 희석 시에는 정백당을 첨가하여 당도를 10°Brix로 조정하였다.

2) 초음파 파쇄

6배 희석한 과즙 200ml를 취하여 빙수 중에서 초음파파쇄기(VC-400, Sonics and Materials, USA)로 300W에서 10분간 처리하였다. 파쇄시에는 pulse for 5초, 휴지 1초로 파쇄하였다.

3) 과즙 성분분석

6배 희석한 과즙 및 초음파 파쇄한 과즙을 filter paper(Whatman No.2)로 여과하고 다음의 분석을 행하였다.

- ① pH 및 산도: pH는 pH meter(model 8519, Hanna)로 측정하였으며, 산도는 과즙 10ml에 지시약(bromothymol blue) 2~3방울가하고 0.01N-NaOH로 중화적정하고 acetic acid 농도(% w/v)로 표시하였다.
- ② 흡광도: 광전비색계(ANA-7A, Tokyokoden)를 사용하여 660nm에서 측정하였다.
- ③ 건물중량: 과즙 20ml를 취하여 60ml에서 예비건조한 후 105°C에서 항량이 될 때까지 건조하고 평량하였다.
- ④ 조지질: Ethyl ether를 사용하여 Soxhlet 법으로 9시간 추출 후 건조하고 평량하였다.
- ⑤ 조단백질: Lowry의 방법에 따라 측정하였다.
- ⑥ 회분: 건물 약 5g을 600°C에서 회화하고 평량하였다.

⑦ 당: 일반 당도는 휴대형 굴절당도계(ATC-1E, Atago)로 측정하였으며, 환원당은 Somogyi-Nelson, 총당은 phenol-H₂SO₄법으로 측정하였다. 환원당은 glucose 농도로 표시 하고 총당은 sucrose 농도로 표시하였다. 유리당은 HPLC(LC-10AT, Shimadzu Co.)를 사용하여 아래의 조건으로 분석하였다.

column: μ -Bondapak C18, 4.6×250mm(Waters Co), solvent: 0.1% H₃PO₄,
column temp.: 30°C, flow rate: 0.5ml/min, detector: UV detector, 210nm,
injection volume: 20 μ l

⑧ 유기산: HPLC(LC-10AT, Shimadzu Co.)를 사용하여 아래의 조건으로 분석하였다.

column: Spherisorb S10 NH₂, 4.6×250mm(Waters Co.),
solvent: acetonitrile/water(80/20, v/v), column temp. 30°C, flow rate:
1.0ml/min, detector: Refractive index and injection volume: 20 μ l

⑨ 무기염류: 회분을 0.1N-HCl에 용해한 후 원자흡광분석기(Spectra A.A-200HT, Varian)로 분석하였다.

2. 결과

1) 일반성분

과즙 희석액은 Table 1과 같이 환원당 65mg/ml, 총당 50mg/ml를 함유하였으며 약 13°의 Brix의 당도를 나타내었다. 조지질과 조단백질 함량은 각각 1.65mg/ml, 2.98mg/ml 였으며 약 8mg/ml의 회분을 함유하였다. 고형분량은 약 100mg/ml로 상당히 높았으며 감귤과일의 내피에서 유래한 섬유질이 약 16mg/ml가 함유되었다. 초음파 파쇄에 의하여 당도, 조지질 및 조단백질 함량이 약 10% 증가 되었으며 여과에 도움을 주었다.

2) 유리당

과즙은 ml당 sucrose 84mg, fructose 46mg, glucose 40mg를 함유하였으며, sorbitol과 lactose는 검출되지 아니하였다.

3) 유기산

과즙은 ml당 약 2mg의 citric acid를 함유하였으며, 약 1.5~2%의 malic, formic, tartaric acid를 함유하였다. Acetic acid 함량은 0.12mg/ml에 불과하였다.

4) 회분

과즙은 ml당 약 8mg의 회분을 함유하였으며 Al과 Sn 함량이 1.0mg 이상으로 전체의 약 70%를 차지하였다. Na와 Mg는 0.4~0.5mg으로 비슷하였으며 초음파 파쇄에 의하여 Al은 감소된 반면에 Na는 증가되었다. 즉, 초음파 파쇄에 의하여 과즙 중에 잔존한 세포로부터 Na는 유리된 반면에 Al은 세포 구조물에 흡착되어 여과시 제거되는 것으로 추정되었다.

Table 1. Specifications of citrus juice used for gel production and improvement in specifications by sonication of the juice

Characteristics	Control juice ¹⁾	Sonicated juice ²⁾
pH ³⁾	4.89±0.03	n.t.
Acidity (% acetic acid) ⁴⁾	0.632±0.009	n.t.
Optical absorbance (at 660nm) ⁵⁾	0.026±0.013	0.35±0.06
Soluble solid (%Brix) ⁶⁾	12.96±0.56	14.35±1.17
Solid (mg/ml) ⁷⁾	101.3±0.8	105.5±0.79
Reducing sugar (glucose, mg/ml) ⁸⁾	65.0±2.9	72.0±3.0
Total sugar (sucrose, mg/ml) ⁹⁾	50.4±1.7	72.5±9.3
Lipid (mg/ml) ¹⁰⁾	1.65±0.12	0.62±0.03
Protein (mg/ml) ¹¹⁾	2.98±0.28	1.68±0.05
Crude fiber (mg/ml) ¹²⁾	15.8±5.7	14.7±6.9
Ashes (mg/ml) ¹³⁾	7.98±0.88	7.36±0.46

A concentrated citrus juice was used in the experiment after dilution by 6 times with distilled water. The juice was purchased from the Jeju Provincial Development Corporation.

¹⁾ analysed after filtration with filter paper(Whatman No.2).

²⁾ analysed after sonication and filtration. Sonication was carried out by using a sonicator(VC-400, Sonics and Materials, USA) for 10 min at 300W with pulse for 5sec and off for 1sec.

³⁾ measured by using a pH meter(8519, Hanna)

⁴⁾ titrated with 0.01N-NaOH and represented as the concentration of acetic acid.

⁵⁾ measured by using a photoelectric spectrometer(ANA-7A, Tokyokoden)

⁶⁾ measured by using a hand carry refractometer(ATC-1E, Atago)

⁷⁾ dried at 105°C

⁸⁾ assayed according to Somogyi-Nelson's method

⁹⁾ assayed by using phenol-H₂SO₄

¹⁰⁾ extracted for 9 hours according to Soxhlet method.

¹¹⁾ assayed according to Lowry's method after extraction with N-NH₄OH

¹²⁾ assayed according to modified-STS method

¹³⁾ dry ashed at 600°C in a electric furnace.

Table 2. HPLC analysis of free sugar and organic acid content in the citrus juice

Free sugars		Organic acids	
Sugar	Content(mg/ml)	Acid	Content(mg/ml)
Glycerol	0.66 (0.3%)	Acetic	0.12
Fructose	46.28 (25.1)	Ascorbic	0.54
Glucose	39.62 (21.5)	Citric	19.88 (76.8%)
Sorbitol	0	Formic	1.88 (7.3)
Lactose	0	Lactic	0.16 (6.6)
Sucrose	83.74 (45.4)	Malic	1.72
Maltose	4.10 (2.2)	Oxalic	0.24
		Succinic	0.08
		Tartaric	1.28 (4.9)
Total	184.40 (100)		25.90 (100)

Sugars and acids in citrus juice diluted by 6 times were analysed by using a HPLC(LC-10AT, Shimadzu Co.). Analytical conditions were

Sugar: column: μ -Bondapak C18, 4.6×250mm(Waters Co), solvent: 0.1% H₃PO₄, column temp.: 30°C, flow rate: 0.5ml/min, detector: UV detector, 210nm and injection volume: 20 μ l

Acid: column: Spherisorb S10 NH₂, 4.6×250mm(Waters Co.), solvent: acetonitrile/water(80/20, v/v), column temp. 30°C, flow rate: 1.0ml/min, detector: Refractive index and injection volume: 20 μ l

Table 3. Contents of inorganic metals in the citrus juice

(unit: mg/ml)

Juice	Na	K	Ca	Mg	Fe	Al	Sn
Control	0.401 ±0.048	0	0.228 ±0.019	0.555 ±0.094	0.011 ±0.003	5.500 ±1.020	1.440 ±0.537
Sonicated	0.761 ±0.043	0	0.137 ±0.040	0.579 ±0.087	0.045 ±0.007	1.963 ±0.415	1.139 ±0.337

The juices diluted by 6 times were filtered with or without sonication. After drying and ashing, inorganics were assayed by atomic absorption spectrometry.

2. 발효균주 분리 및 분리균의 성장

가. 재료 및 방법

1) 배지

발효균주의 분리 및 배양에 사용한 배지의 종류와 조성은 아래와 같다. 고체배지는 2%의 agar를 첨가하였으며 모든 배지는 0.75Kg/cm²에서 10분간 가압살균 하였다. 감귤과즙은 제주개발공사에서 구입한 감귤과즙 농축액을 사용하였다.

① 감귤과즙배지 (Citrus juice medium, Citrus juice)

농축 감귤과즙 100ml, dist water 1L pH 3.5~4.0

② Tryptone-Yeast extract-Ammonium acetate (TYA)

glucose 10g, peptone 6g, yeast ext. 2.0g, sodium acetate 3g, KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.4g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01g, dist. water 1L pH 6.5

③ Sucrose-Acetate (SA)

sucrose 20g, acetic acid(glacial) 25ml, peptone 5.0g, vitamin mix. 0.5g, mineral mix. 2.0g, dist. water 1L pH 3.5

④ Ethanol

yeast ext. 10g, calcium carbonate 20g, ethanol 26ml(95%), dist water 1L
pH 6.5

2) 배양

고체배양의 경우에는 30℃에서 48시간 정치배양하였고, 겔 생성을 위한 액체배양의 경우에는 30℃에서 14일간 정치배양하였다.

3) 분리 및 개질

Tea fungus로부터 분리한 겔 생성균 TF-2를 SA배지에 반복 배양하여 large colony를 형성하는 TL-2를 분리하였으며, 동 균주를 2%의 citric acid를 첨가한 감귤과즙배지에 수회 반복배양하고 생성된 겔로부터 TL-2C를 분리하였다.

4) 동정

한국 유전자은행에 의뢰하여 분리균 TL-2의 16S rDNA의 염기서열을 분석하고 유전자은행의 표준균주와 비교하여 동정하였다.

5) 균체 형태관찰

- ① 광학현미경: 발효초기(2-3일)의 겔을 수거하여 slide glass에 부착시키고 살균한 인산완충용액(1/15M, pH 6.8)으로 세척하여 부착물을 제거하였으며 crystal violet으로 염색한 후 현미경(YSE-H, Nikon)으로 검경하였다. 균체의 크기는 사진으로부터 측정하였다.
- ② 전자현미경: 14일간 배양한 겔을 인산완충용액으로 세척 한 후 황으로 절단하여 중앙부위를 노출시킨 후 동결건조(critical drying)하고 Au-coating 하여 투과형 전자현미경(S-800, Hitachi)으로 관찰하였다.
- ③ 기타: 14일간 배양한 겔을 인산완충용액으로 세척한 후 crystal violet으로 2분간 염색하고 증류수로 세척하여 균체 밀집부위를 조사하였다.

나. 결과

1) 균주분리 및 개질

Mother strain으로 사용한 겔 생성균 TF-2는 산 생성능력이 비교적 약한 균주로서 TYA 배지에서 매우 작은 colony를 생성하였다. 이 균주가 생성한 겔로부터 Table 4와 같이 겔 생성능력이 우수하고 직경 약 0.5mm의 비교적 큰 colony를 형성하는 균주 3종을 분리하였다. 이 균주들로부터 ethanol 자화성은 있으나 산 생성능력이 약한 TL-2를 발효균으로 선별하였다. 분리균 TL-2는 Table 5와 같이 CG-1 및 CG-2에 비하여 겔 생성능력은 유의적으로 높은 반면에 산 생성능력은 낮은 특성을 나타내었다.

한편, 감귤과즙으로부터 겔을 생산할 목적으로 TL-2를 citric acid를 함유한 SA 배지에 반복 배양하여 분리한 TL-2C는 Table 6과 같이 citric acid 0.4% 이상의 농도에서 TL-2에 비하여 유의적으로 높은 내성을 나타내었다. TL-2와 TL-2C를 10배 희석한 감귤과즙배지에 배양한 경우에는 Table 7과 같이 생성된 겔의 두께가 약간 증가하는 경향을 나타내었으나 큰 차이는 없었다.

Table 4. Growth characteristics of gel forming bacteria derived from *Gluconacetobacter hansenii* TF-2¹⁾

		Isolated bacterium		
		TL-2	CG-1	CG-2
Colony size(dia.)	color	< 0.5mm yellowish grey	< 0.5mm grey	< 0.5mm grey
Cell length(μ m)	shape	3-6 rod, irregular	5 - 10 rod, irregular	10-15 rod, irregular
	motility	-	-	-
Growth as sole C-source	glucose	+++	+++	++
	sucrose	++	++	+
	ethanol	+	+	-
	sorbitol	+	+	++
Clear zone formation on carbonated ethanol medium		\pm	+	-
Growth characteristics on solid TYA		film like	film like	film like
Growth characteristics on liquid TYA				
static cultivation	gel formation	+ ²⁾	+	+
	broth	clear	clear	clear
shaking cultivation	gel formation	+++ ³⁾	+++	+++
	gel color	light brown	white	white
	gel surface	rough	smooth	smooth
	broth	clear	clear	clear

¹⁾ Low acid producing strain isolated from tea fungus.

²⁾ Gels having thickness above 5mm was produced by cultivation for one week.

³⁾ Gels grew as a big clump.

Table 5. Gel producing ability and its related characteristics of isolated bacterial strains

	Control*	TL-2	CG-1	CG-2
Gel				
thickness(mm)	0	13.8±0.45 ^{a)}	3.8±0.45 ^{b)}	3.4±0.55 ^{b)}
weight(mg/200mm ² , wet)	0	3,226±421 ^{a)}	758±69 ^{b)}	663±52 ^{b)}
specific gravity	0	1.169	0.997	0.975
Cultural broth				
pH	3.65±0.03 ^{a)}	3.12±0.16 ^{b)}	2.98±0.07 ^{b)}	2.92±0.05 ^{b)}
turbidity at 660nm	0.17±0.07 ^{ns)}	0.22±0.05	0.15±0.09	0.16±0.01
acidity(% , acetic acid)	0.55±0.06 ^{c)}	0.66±0.01 ^{b)}	0.86±0.04 ^{a)}	0.86±0.01 ^{a)}
residual sugar(°Brix)	10.44±0.18 ^{a)}	8.80±0.34 ^{c)}	9.72±0.28 ^{b)}	9.82±0.08 ^{b)}

*Cultural broth was incubated without inoculation of the bacterium.

Concentrated citrus juice was used as the medium after dilution by 10 times with distilled water. Sugar content of the broth was adjusted to 10°Brix with white sugar and the broth was sterilized for 10min. at 0.75Kg/cm². After inoculation of bacterial seed culture, the broth was stationary cultivated for 14 days at 30°C. Seed culture was previously prepared by shaking cultivation of each bacterium for 48 hours at 30°C in TYA medium. The broth cultivated for 14 days was filtered through membrane filter(0.45µm) for measurement of acidity and others. Values are mean±SD(n=5) and those with different subscriptions in a line are significantly different at p<0.05 by Tukey's method. ns: not significant.

Table 6. Compared thickness of the gel produced by TL-2C with that by TL-2 in the presence of various concentrations of citric acid

Citric acid (%)	Gel thickness (mm)			
	Fermented for 6 days		Fermented for 14 days	
	TL-2	TL-2C	TL-2	TL-2C
0	4.1±0.3	3.6±0.3	5.9±0.2 ^{ns}	5.3±0.9
0.4	2.7±0.3	4.3±0.8	3.2±0.6 ^{b)}	6.2±0.5 ^{a)}
0.8	2.3±0.3	3.3±0.5	2.6±0.7 ^{ns}	4.5±0.4
1.6	2.1±0.2	3.1±0.2	2.0±0.0 ^{b)}	3.1±0.3 ^{a)}
4.0	NG	2.2±0.3	1.0±0.6 ^{b)}	2.7±0.3 ^{a)}

The organisms were cultivated for 14 days in SA medium to compare the resistance against citric acid. The medium contained various concentrations of citric acid. Values are mean±S.D.(n=5) and those with different subscriptions in a line are significantly different at p<0.05 by multiple range test. NG: no growth, ns: not significant.

Table 7. Compared characteristics of mutant strains regarding citrate-resistance, acid production and gel thickness

Parameters	TL-2 ¹⁾	TL-2C ²⁾
pH	2.8-3.4	2.6-3.2
Acidity (% acetic acid)	1.2-1.5 ³⁾	1.5-2.2
Gel thickness (average)	9-11	11-12
(maximum)	11-13	20 <
Resistance to citrate ⁴⁾		
in SA medium	> 1%	4% <
in TYA medium	> 3%	4% <

¹⁾ Large colony forming strain derived from TF-2

²⁾ Citric acid-resistant strain derived from TL-2

³⁾ Values were measured after 14 days of fermentation in citrus juice medium.

⁴⁾ Resistable concentration of the bacterium was represented as the concentration of citric acid which repressed gel thickening by 50%.

2) 균주동정

TL-2는 16S rDNA base pair의 partial sequencing에 의하여 Table 8과 같이 *Glucon(o)acetobacter hansenii*와 99.66%의 높은 유사성을 나타내어 *G. hansenii*로 동정되었다.

Table 8. Base sequence similarity of the gel producing bacterium TL-2 in 16S rDNA

Base sequence					
10	20	30	40	50	
GCTGGCGGC	ATGCTTAACAC	ATGCAAGTC	GCACGAACCT	TTCGGGGTTAG	
TGGCGGACGGGT	GAGTAACGCGT	TAGGGATCT	GTCCATGGGT	GGGGGATAA	
CTTTGGGAAACT	GAAGCTAATA	ACCGCATGAC	ACCTGAGGGT	CAAAGGCGC	
GAGTCGCCTGT	GAGGAACCTG	CGTTCGATT	AGCTAGTTGGT	GGGGTAAA	
GGCCTACCAAG	GCGATGATCG	ATAGCTGGT	CTGAGAGGAT	GATCAGCCAC	
TGGGACTGAGAC	ACGGCCCAG	ACTCCTACG	GGGAGGCAG	CAGTGGGGAA	
TATTGGACAAT	TGGGCGCA	AGCCTGATCC	AGCAATGCC	CGTGTGTGA	AGA
AGGTTTTTCG	GATTGTAA	AGCACTTTC	AGCGGGGAC	GATGACGGT	ACC
CGCAGAAGA	AGCCCCG	GCTAACTTC	GTGCCAGC	AGCCGCGT	AATACGAA
GGGGGCAAG	CGTTGCTC	GGAATGACT	GGGCGTAA	AGGGCGCGT	AGGCGGT
TGTTACAGT	CAGATGTG	AAATTCCC	GGGCTTAA	CTGGGGGCT	GCAATTTG
ATACGTGAC	GACTAGAG	TGTGAGAG	GGGTTGTG	GGAATT	

Standard strains	Similarity
<i>Gluconoacetobacter hansenii</i> LMG1527T	99.66%
<i>Gluconoacetobacter europaeus</i> DSM6160T	99.15
<i>Gluconoacetobacter xylinus</i> BPR2001T	98.81
<i>Gluconoacetobacter xylinus</i> LNG1515T	98.64
<i>Gluconoacetobacter diazotrophicus</i> LMG7603T	97.28
<i>Gluconoacetobacter sacchari</i> DSM12717T	96.94
<i>Gluconoacetobacter liquefaciens</i> LMG1382T	96.43

16S rDNA of the bacterium was consisted of 589 base pairs. Base sequence was compared with the standard strain of Korean Bank of Genetic Resources.

3) 분리균의 형태

G. hansenii TL-2는 길이 3~5 μm 의 간균으로서 Fig. 1-A와 같이 세균 filament를 잘 형성하였으며, 전자현미경 상으로는 Fig. 1-B와 같이 정상적인 형태(n)는 드물고 중앙부위가 부풀거나(s), 균체가 vibrio형으로 휘어지거나(v) 심하게 꺾어지고(sn), 균체의 극 부위에서 구형의 돌기가 돌출(화살표)되는 등으로 매우 불규칙한 형태를 나타내었다.



Fig. 1. Morphologies of *Gluconoacetobacter hansenii* TL-2 isolated for production of gel from the juice of citrus fruit.

Left: photograph was taken with a scanning electron microscope (S-800, Hitachi) after critical drying and Au-coating. The cells had irregular shape by swelling(S), snapping(Sn) and venting(V). The bulbs extruded at the arrows. Scale line indicates 1.0 μm .

Right: photograph was taken with a light micrograph(YSE-H, Nikon) after staining with crystal violet. Scale line indicates 10 μm .

4) 겔 중 발효균의 위치

겔 중 세균을 crystal violet로 염색하고 증류수로 여분의 염료를 제거한 결과 Fig. 2와 같이 겔의 중앙부위에 명확한 선(좌측 plate)이 나타났으며 이 부위는 균체가 밀집(우측 plate)된 부분으로서 선은 crystal violet에 염색된 균체에 의한 것으로 판단되었다.

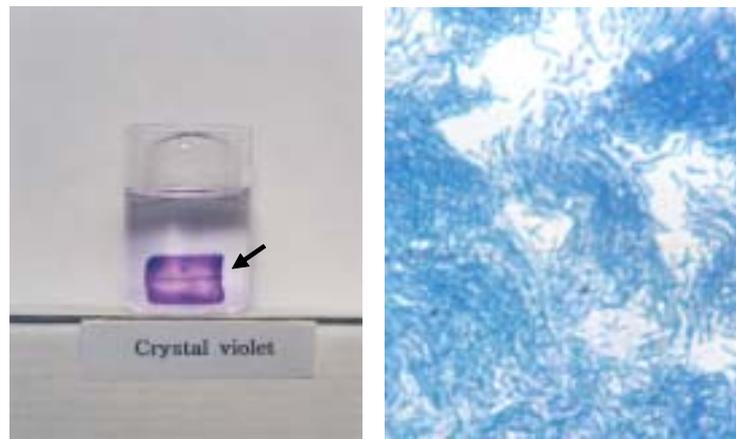


Fig. 2. Location of the gel producing bacterium in the gel

Cross-sectioned gel(left plate) show an apparent central line at the arrow by staining with crystal violet. The line was consisted of a large number of the gel producing bacteria.

3. 겔 발효조건 설정

가. 재료 및 방법

1) 생과즙 발효

가) 과즙

2001년 12월에 온주밀감(제주, 서귀포산)을 구입하여 박피하고 압착하여 착즙한 후 부식포와 filter paper로 여과한 여액을 재료로 사용하였다.

나) 과즙 배지작성

감귤과즙 25ml에 멸균증류수를 가하여 총량을 150ml로 희석한 다음 시판 백설탕을 최종 당도를 10° Brix로 조정하였다. 0.1N-acetic acid와 0.1N-NaOH로 배지의 pH를 3.98로 조정하고 발효병(내경: 47mm, 높이: 47mm)에 85ml씩 분주하였다.

2) 발효균

겔 발효균 *G. hansenii* TL-2를 발효균으로 사용하였다. TF-2의 전배양에서 생성된 두께 약10mm의 겔을 종균으로 사용하였으며 종균 접종량은 5%로 하였다.

3) 발효

종균 접종 후 발효병 입구를 살균 filter paper(Watman No.2)로 덮은 다음 30°C의 배양실에서 정치배양하였다. 배양과정 중 경과일수에 따라 발효액의 pH, 산도, soluble solid 및 겔의 두께 변화를 측정하였다. 겔의 두께는 발효병에 눈금 모눈종이를 부착하여 발효 경과일수에 따라 mm단위로 측정하였다.

나. 결과

1) 감귤과즙 첨가량에 따른 변화

공시한 과즙은 평균당도 13.2°Brix로서 ml당 비환원성 당 102.2mg(sucrose로 환산), 환원당 33.3mg(glucose로 환산)을 함유하였으며 평균산도 1.23%(acetic acid로 환산), pH 3.98을 나타내었다.

감귤과즙 첨가량을 달리하여 발효시킨 결과 18일간의 발효에 의하여 Fig. 3과 같이 배지의 상층부에 두께 12~16mm의 겔을 생성하였다. 과즙 첨가량 25% 이상(2 및 4 배 희석)의 시험구에서는 겔의 아래쪽에 황색의 이물질이 부착되었고 겔의 위쪽 표면도 평활하지 못하였다. 외관상 백색으로 나타난 겔 부위의 두께는 Fig. 4와 같이 과즙 11%(9배 희석) 첨가군은 14.5±2.3mm, 17%(6배 희석) 첨가군은 15.0±2.8mm, 25%(4배 희석) 첨가군은 12.0±3.6mm로 17% 첨가군이 가장 두꺼웠으나 과즙농도 11~25% 사이에 유의성은 없었다. 첨가량 17% 이하에서는 이물질이 거의 부착되지 아니하였으며 표면의 평활도도 높았다.



Fig. 3. Gel fermentation systems by *G. hansenii* TF-2

Gels were produced by static culture of citrus juice for 18 days at 30°C with inoculation of seed gel. The gel previously produced by *G. hansenii* TF-2 was used as the seed gel and it contained large number of the bacterium. Each bottle contained 85ml of the broth and top of the bottle was covered with sterilized filter paper(Whatman No. 2). Numbers at the top of bottles indicate dilution fold of the citrus juice.

산도는 발효 12일까지는 전 시험구에서 변화의 폭이 적었으나 12일 이후로 급격히 증가하여 발효 18일에는 11% 첨가구는 약 0.9%에 달하였고 17% 및 25% 첨가구는 약 1.8%에 달하였다. 발효 18일째의 산도를 기준으로 하였을 때 17%와 25% 첨가구는 유의적인 차이가 없었으나 11% 첨가구와는 유의적인 차이가 있었다($p>0.05$). 한편, 발효액의 pH는 0일째 3.90에서 발효 18일째는 2.75~2.30으로 점차적으로 저하되었으며 첨가량 25% 이하의 시험구 사이에는 유의적인 차이가 없었다.

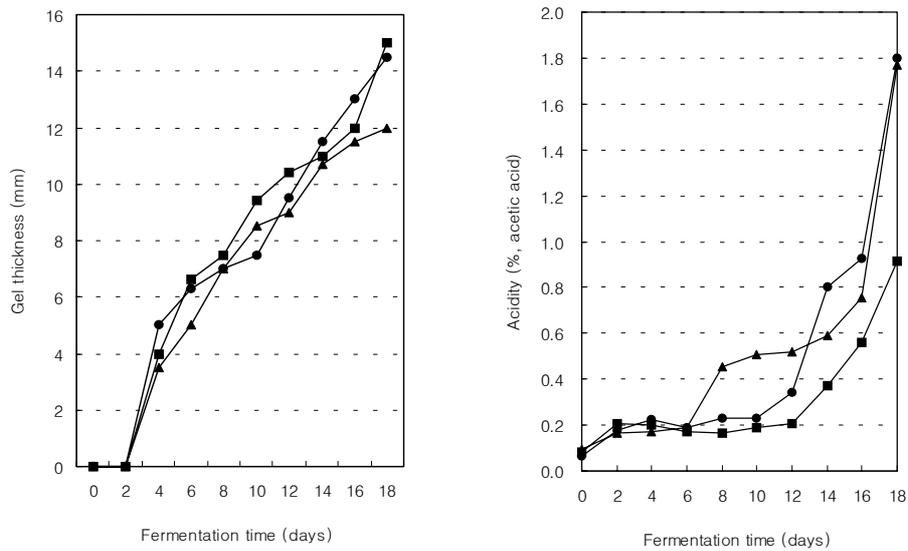


Fig. 4. Effect of citrus juice concentration on gel thickness and acidity of the cultural broth

Sugar content of each fermenting broth was controlled to 10°Brix by using white sugar. Fermentation was carried out by static culture of inoculated broth 30°C. Inoculum size of seed gel was approximately controlled to 5%. Symbols represent dilution folds of the citrus juice as —●—: 8 times(11%), —■—: 6 times(17%) and —▲—: 4 times(25%).

2) 발효온도에 따른 발효성상

배양 온도에 따른 발효계의 변화는 Fig. 5와 같다. 발효경과 18일째 피막 두께를 비교하면 40°C 이상에서는 겔이 형성되지 아니 하였고 25°C에서는 13.4mm, 30°C에서는 13.0mm, 35°C에서는 10.8mm로 25~35°C 구간에서는 큰 차이는 없었다. 다만 30°C에서 배양한 피막의 표면이 가장 평활하였다. 발효 18일째의 산도는 25°C가 0.63%, 30°C는 1.08%, 35°C는 1.73%로 발효온도가 높을수록 산도도 증가되었다. 그러나 발효가 정지된 40°C에서 발효 3일에 0.22%로 증가한 후 발효 18일까지 변화가 없었다. 25~35°C에서 발효한 발효액의 pH는 0일째 pH 3.96에서 점차적으로 낮아져서 발효 18일째는 pH 2.3~2.40를 나타내었으나 40°C는 3.57로 거의 변화가 없었다.

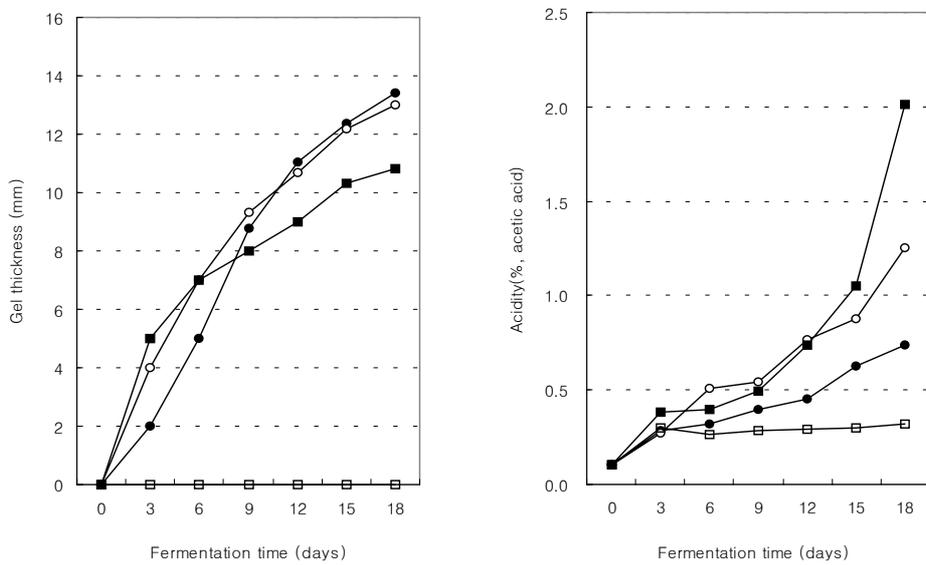


Fig. 5. Changes in gel thickness and acidity of cultural broth during fermentation at different temperatures

Cultural broth contained 17% of citrus juice and 10°Brix of white sugar. Initial pH was adjusted to 3.98. Symbols represent the fermentation temperature as —●—: 25°C, —○—: 30°C, —■—: 35°C and —□—: 40°C. Values are mean of 5 samples.

3) 당 농도에 따른 발효성상

발효액의 초기 당도를 5°~20° Brix로 조정 한 뒤 30℃에서 정치배양하면서 경과일 수에 따른 겔 두께를 측정 한 결과, Fig. 6과 같이 5° Brix에서 8.8mm, 10°에서 12.7mm, 20°에서 8.8mm, 30°에서 4.5mm 두께의 겔이 생성되어 10° Brix에서 가장 두껍고 30°Brix에서 가장 얇게 생성되었다. 발효 18일째의 산도는 0.24%(5°Brix)~1.93%(10°Brix)로 변화의 폭이 컸었다. 특히 5°Brix 첨가구는 배양 9일까지 증가하다가 이후로는 감소되는 특이한 양상을 나타내었으며, 발효액의 pH는 0일의 pH 3.74~4.0에서 점차적으로 낮아져서 18일째에는 1.92(20°Brix)~3.16(5°Brix)를 나타내었다.

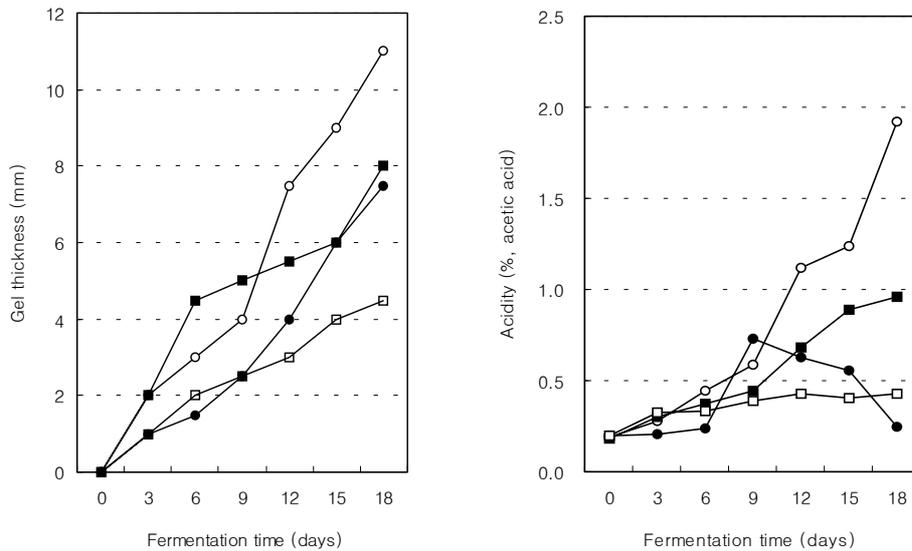


Fig. 6. Effect of sugar concentrations on gel thickness and acidity of the cultural broth

Sugar concentration was adjusted by using a hand carrier refractometer(Atago, ATC-1E). Symbols represent initial sugar concentrations as —●—: 5°, —○—: 10°, —■—: 20° and —□—: 30°Brix.

4) 초기 pH가 겔생성에 미치는 영향

발효액의 초기 pH가 겔 두께에 미치는 영향은 Fig. 7과 같이 pH 2.0 이하에서는 발효가 정지되었으며 5.0 이상에서는 겔 두께가 현저히 감소되었다. 최적 pH는 3.0으로 나타났으나 3.0~4.0에서는 유의적인 차이는 없었다.

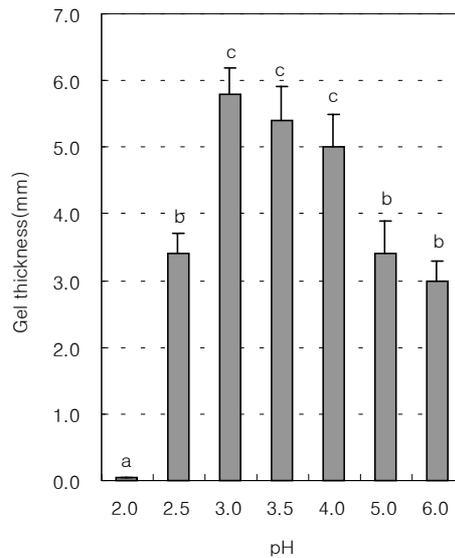


Fig. 7. Effect of initial pH of the cultural broth on gel thickness

Gels were fermented by using the minimal medium(SA) as described in the Methods. pH was adjusted by using 0.1N-acetic acid and 0.1N-NaOH. Values with different subscriptions are significantly different at $p < 0.05$.

5) 시험발효

이상 검토된 최적조건들(과즙 17%, 당도 10°Brix, pH 3.0)을 적용하여 30°C에서 18일간 배양한 결과 Fig. 8과 같이 배양 3일 후부터 배양액의 표면에 겔이 형성되기 시작하였으며 배양 18일에는 $14.2 \pm 0.6\text{mm}$ 로 성장하였다. 한편 배양액의 산도는

1.90±0.22%로 개별 시험시 보다 다소 높게 생성되었다. pH는 2.6~2.8에서 안정되었으나 가용성 고형분은 배양 개시 후 연속적으로 증가되었다. 당도는 배양 개시시의 총당 100.3mg/ml로부터 경시적으로 감소되어 배양 종료시에는 27.1±4.2mg/ml가 잔존하였다. 환원당은 초기의 33.3±2.2mg/ml로부터 배양 3일째에는 54.2±5.9mg/ml로 일시적으로 증가하였으며, 이 후 경시적으로 감소되어 배양 18일에는 6.9±1.2mg/ml가 잔존하였다.

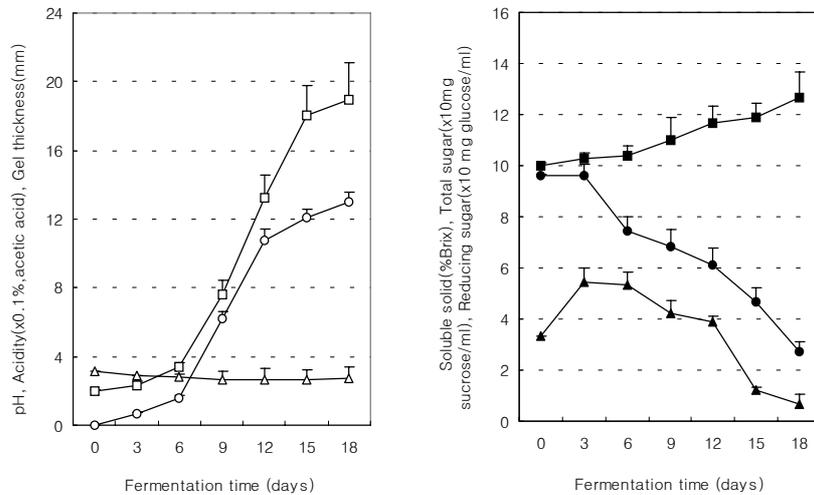


Fig. 8. Procedures of gel fermentation with adoption of some examined optimal conditions and changes in residual sugar content during the fermentation

Cultural broth contained 17% of citrus juice, 10°Brix of sugar and initial pH 3.0, was statically cultivated at 30°C. Residual sugar assay was accorded to Somgyi-Nelson. Aliquot of cultural broth was filtered through syringe filter(MFS 25) and hydrolysed by using 0.2N-HCl for 30 minutes at 100°C. Symbols are —○—: gel thickness, —□—: acidity, —△—: pH, —■—: soluble solid, —●—: total residual sugar and —▲—: reducing sugar.

4. 농축과즙발효

가. 재료 및 방법

1) 감귤과즙

제주개발공사에서 착즙한 평균당도 65°Brix의 서귀포 산 온주밀감 농축액(이하 과즙으로 약함)을 사용하였다. 과즙은 -20℃에서 저장하였으며 사용 전에 filter paper (Watman No.2)로 여과하였다.

2) 발효균

Citrate 내성균 *G. hansenii* TL-2C를 사용하였다.

3) 배지조제 및 발효

과즙을 멸균 증류수로 100배 희석하고 정백당을 가하여 당도를 10°Brix로 조정된 것을 표준 배지로 하였다. 배지를 내경 47mm의 발효병에 85ml씩 분주하고 전배양한 겔을 접종한 다음 발효병 입구를 살균 filter paper로 덮어 30℃의 배양실에서 14일간 정치배양 하였다. Seed 겔 접종량은 배양액의 5%로 하였다.

4) 과즙 첨가량에 따른 발효성상

과즙을 60~120배로 희석하여 가당하고 과즙 첨가량에 따른 발효액의 pH, 총산함량 및 생성된 겔의 두께를 측정하였다.

5) 탄소원 첨가에 따른 발효성상

당: 과즙 100배 희석액에 glucose, fructose 및 sucrose를 10~30°Brix가 되도록 첨가하고 경시적으로 발효액의 pH, 총산 및 겔 두께를 측정하였다.

알콜 및 식초산: 정백당을 첨가한 표준배지에 0~2.0%의 주정(95%, 풍국주정) 또는 빙초산을 첨가하였다.

6) 통계처리

SAS package를 사용하여 Anova program으로 $p < 0.05$ 수준에서 유의성 검정.

나. 결과

1) 과즙첨가량에 따른 발효성상

과즙 단독발효: 감귤과즙을 5~10배로 희석하여 발효한 결과 Fig. 9와 같이 6배 희석액에서 $7.5 \pm 0.44\text{mm}$ 의 가장 두꺼운 겔이 생성되었으나 5~7.5배 희석액 사이에 유의적인 차이는 없었다.

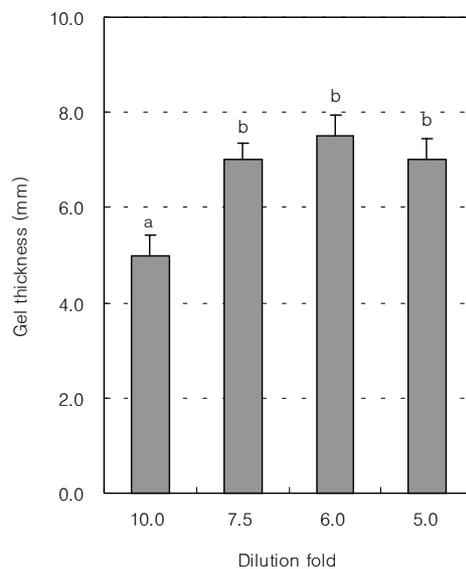


Fig. 9. Effect of citrus juice concentrations on the gel fermentation by *G. hansenii* TL-2C

Commercial citrus juice, a concentrate by 6 times, was used as the cultural broth after dilution by 5~10 times with distilled water. After inoculation of seed gel, the broth was statically cultivated for 14 days at 30°C without supplement of any other nutrient. The juice concentrate was purchased from Jeju Provincial Development Corporation. Columns in the Fig. with different subscription are significantly different at $p < 0.05$.

가당 발효: 과즙을 60~120배 희석하고 정백당을 가하여 10°Brix로 조정된 가당 배지를 사용한 경우에 pH는 Fig. 10-A와 같이 0일의 3.66~3.86으로부터 점차적으로 낮아져서 발효 14일에는 2.26~2.74에 달하였다. 이 과정에서 희석배율 80배 이상에서는 희석배율에 따른 차이가 없었으나, 60배 희석액에서는 발효 6일까지 다른 시험구에 비하여 pH 변화가 적었다. 산도는 Fig. 10-B와 같이 희석배율에 따라 상이한 변화를 나타내었다. 즉, 60배 희석액에서는 산도에 거의 변화가 없었으나, 80~120배 희석액에서는 발효중기(4-10일)에 일단 상승하였다가 다시 감소되었다. 120배 희석액에서는 0일의 0.34%로부터 8일에는 3.18%로 증가되었으며 이 후 급격히 감소되었다. 100배 희석액도 발효 6~8일에 4.08~4.20%로 증가된 다음 이 후부터 급격히 감소되는 비슷한 형태를 나타내었다. 80배 희석액은 발효 4일에 2.14%까지 증가된 후 급격히 감소되었다. 겔은 Fig. 10-C와 같이 발효 2~3일 후부터 발효액 표면에 서서히 생성되기 시작하여 발효 14일째에는 100 및 120배 희석액에서는 평균두께 7.5mm, 80배 희석액에서는 6.5mm, 60배 희석액에서는 5.0mm로 성장하였다.

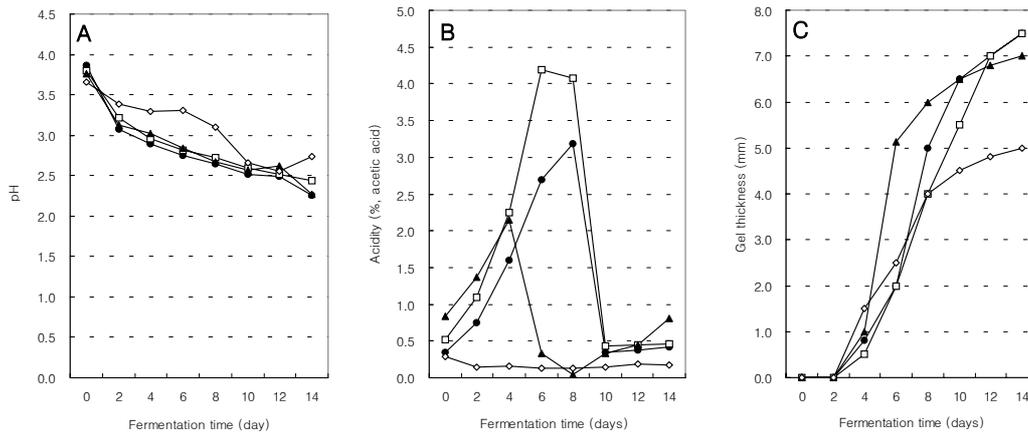


Fig. 10. Effect of citrus juice concentration on pH, acidity and gel thickness during citrus gel fermentation by *G. hansenii* TL-2C

The juice concentrate was diluted by 60~120 times to examine the effect of carbon source addition on gel fermentation. Sugar content of the diluted juice was controlled to 10°Brix by using white sugar. Symbols represent the dilution fold as \diamond : $\times 60$, \blacktriangle : $\times 80$, \square : $\times 100$ and \bullet : $\times 120$.

2) 당 종류와 농도에 따른 발효성상

당의 종류와 농도를 달리하여 14일간 발효한 결과 Table 9와 같이 glucose 10°Brix 첨가구에서 두께 7.5±0.61mm로 가장 두꺼운 겔이 생성되었고 총산도도 1.53±0.12%로 유의적으로 높았다. 당의 종류별로는 glucose 첨가구가 산도가 가장 높았고 겔도 가장 두꺼웠으며 fructose가 가장 낮은 경향을 나타내었다.

Table 9. Effect of sugar kinds and concentrations on gel fermentation by *G. hansenii* TL-2C

Sugar ¹⁾	Cultural broth		Gel thickness ³⁾ (mm)	
	pH	Acidity ²⁾ (%, acetic acid)		
Glucose	10%	2.07±0.08 ^{cd4)}	1.53±0.12 ^a	7.5±0.61 ^a
	20%	2.22±0.09 ^c	0.52±0.05 ^d	6.4±0.42 ^{cd}
	30%	2.05±0.09 ^{cd}	0.76±0.08 ^c	4.0±0.41 ^e
Fructose	10%	2.90±0.14 ^a	0.13±0.03 ^{gf}	4.5±0.35 ^b
	20%	2.70±0.04 ^b	0.25±0.03 ^e	3.2±0.57 ^{ed}
	30%	2.78±0.07 ^{ab}	0.20±0.04 ^{ef}	2.0±0.35 ^b
Sucrose	10%	2.67±0.07 ^b	0.20±0.04 ^{ef}	6.4±0.42 ^c
	20%	1.93±0.08 ^d	0.93±0.05 ^b	6.0±0.35 ^f
	30%	2.82±0.11 ^{ab}	0.11±0.02 ^g	3.5±0.35 ^b

¹⁾Sugars were added to citrus juice diluted by 100 times

²⁾Total acidity was measured by using 0.01N-NaOH and represented as acetic acid concentration(% , w/v).

³⁾Gels were fermented by static cultivation for 14 days at 30°C

⁴⁾Values with different subscripts are significantly different at p<0.05. by Duncan's multiple range test.

한편, 초기당도 10°Brix에서 당의 종류만 달리한 경우의 경시적 변화는 Fig. 11과 같다. 즉 pH는 Fig. 11-A와 같이 fructose와 sucrose 첨가구는 점차적으로 낮아졌으나, glucose 첨가구에서는 배양 2~6일 사이에 급격하게 낮아지는 상이한 변화를 나타내었다. 산도는 Fig. 11-B와 같이 모든 시험구가 0일의 0.47~0.48에서 발효 2일째에는 0.66(glucose)~1.08(sucrose)로 증가하였다가 발효 6~8일에는 0.1% 이하로 감소되었다. 8일 이후부터 fructose와 sucrose 첨가구는 0.1~0.2%로 소폭 증가하여 발효 14일까지 안정화되었으나, glucose 첨가구는 8일 이후 큰 폭으로 계속하여 증가하여 14일에는 1.53%를 나타내었다. 겔은 Fig. 11-C와 같이 발효 2일째부터 생성되기 시작하여 모든 시험구에서 점차적으로 두꺼워 졌으나 당의 종류에 따라 두께의 증가속도에 차이가 있었다. Glucose 첨가구는 발효 14일까지 두께가 직선적으로 증가하여 14일에는 평균두께 7.5mm에 도달한 반면에 fructose와 sucrose 첨가구는 발효 6~10일 이후부터 증가속도가 떨어져서 발효 14일에는 각각 평균두께 4.2 및 6.5mm 에 달하였다.

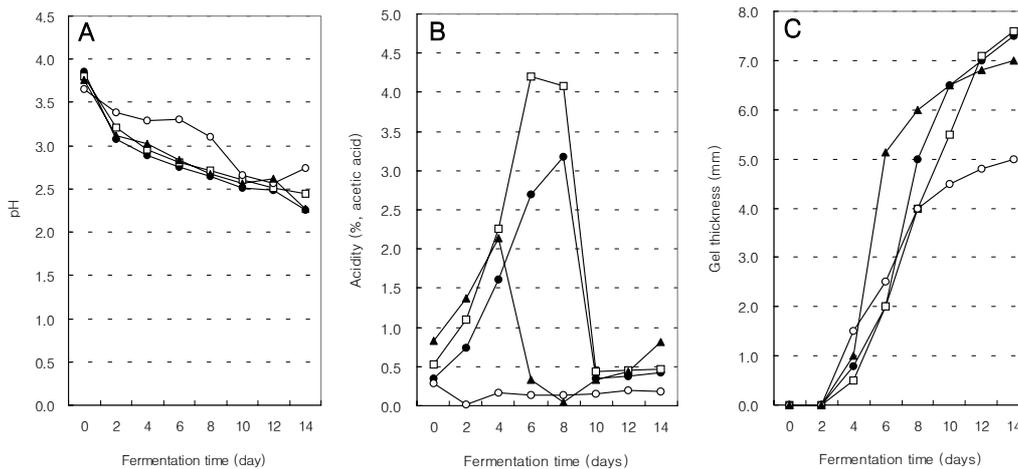


Fig. 11. Changes in pH, total acidity and gel thickness during citrus gel fermentation by using different sugars

Sugars were added to diluted citrus juice by 100 times. Concentration of each sugar was adjusted to 10°Brix. The gels were fermented by static culture of *G. hanseni* TL-2C at 30°C. Symbols are -●-: glucose -■-: fructose and -▲-: sucrose

3) 에탄올 첨가의 영향

정백당으로 당도를 10°Brix로 조정한 배지에 주정을 추가하여 발효한 경우에 발효액의 pH, 산도 및 겔 두께의 경시적인 변화는 Fig. 12와 주정 첨가시 발효액의 pH는 Fig. 12-A와 같이 대조구와 비슷한 경시적 변화를 나타내었으나, 산도와 겔 두께는 Fig. B 및 C와 같이 현저한 차이를 나타내었다. 즉, 산도는 대조구가 0일의 0.05%에서 발효 4일에는 0.23%, 14일에는 0.32%로 완만하게 증가한 반면에 1.0 및 2.0% 첨가구는 8일째에 각각 0.60 및 1.49%로 증가하였으며 이 후로는 안정화 되었다. 4.0% 첨가구는 발효 4~8일에 직선적으로 증가되어 1.60%에 달하였다. 발효 14일째의 겔 두께는 1.0% 첨가구가 15.0mm로 가장 두꺼웠으며, 2.0% 첨가구가 13.5mm, 4.0% 첨가구가 11.0mm, 대조구가 8.0mm 였다. 주정을 가하여 14일간 배양한 결과 배양액 liter 당 평균 172g의 wet gel(dry gel 약 4.5g 상당)이 생산되었다.

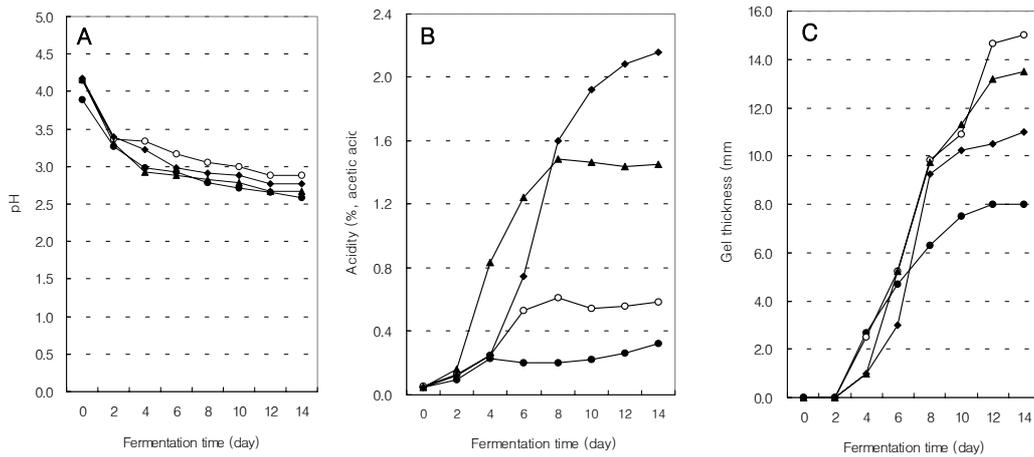


Fig. 12. Effect of ethanol addition on pH, acidity and gel thickness during citrus gel fermentation by *G. hansenii* TL-2C

Cultural broth contained 1% of citrus juice concentrate, 10°Brix of white sugar and designated concentrations of spirit. Symbols represent the concentration of spirit as ○: control, ●: 1.0%, ▲: 2.0% and ◆: 4.0%

4) Acetic acid 첨가의 영향

Acetic acid 첨가시 발효액의 pH는 Fig. 13-A와 같이 0일에는 2.84(2.0%)~3.89(대조구)로 산 첨가농도에 따라 차이가 있었으나 발효 14일에는 2.50~2.64로 비슷한 pH를 나타내었다. 산도는 Fig. 13-B와 같이 0일의 0.05%로부터 발효 14일에는 0.32%로서 서서히 증가되었으며 0.5% 첨가구는 0일의 0.56%에서 8일에는 0.75%로 증가되었으며 이후로는 안정화 되었다. 1.0 및 2.0% 첨가구는 6~10일 사이에 각각 1.23 및 2.25%까지 상승되었으나 발효 14일에는 첨가농도보다 다소 높은 1.1 및 2.1%로 감소되었다. 겔은 Fig. 13-C와 같이 첨가량 1.0% 이상에서는 초기 생성이 지연되었으나 발효 14일에는 첨가량과 관계없이 두께 8.0mm로 성장하였다.

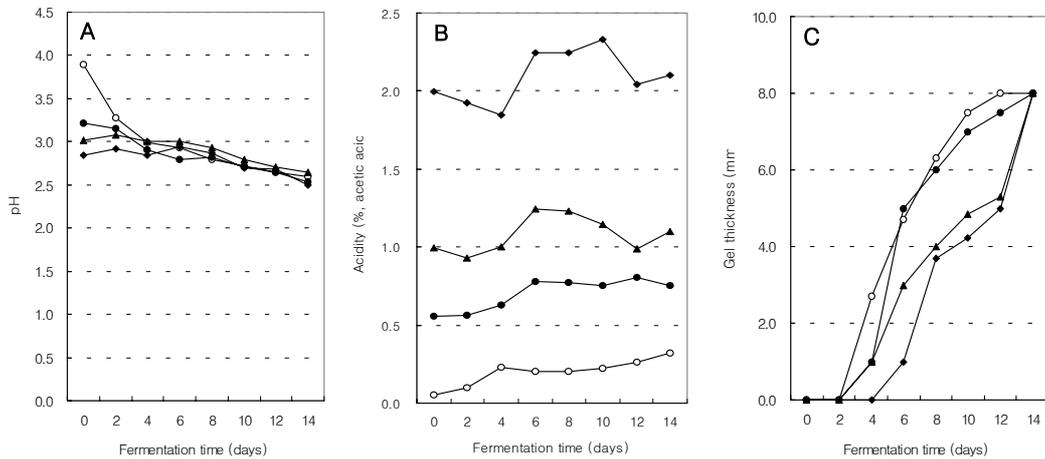


Fig. 13. Effect of acetic acid addition on pH, acidity and gel thickness during citrus gel fermentation by *G. hansenii* TL-2C

Experimental conditions were same as in the Fig. 12 except that acetic acid was used instead of spirit. Symbols represent concentrations of the acetic acid as -○-: control, -●-: 0.5%, -▲-: 1.0% and -◆-: 2.0%.

5. 발효에 의한 성장변화

가. 재료 및 방법

1) DNA 추출 및 정량

Schneider 등의 방법에 따라 동결건조한 껌 100mg에 5%-trichloacetic acid 5ml를 가하고 실온에서 15분간 방치하여 산 가용성 성분을 추출한 후 diethyl ether-alcohol(50:50)로 50℃에서 지질을 추출하였다. 이 과정을 2회 반복한 후 0.3N-KOH 5ml를 가하여 37℃에서 alkali 가용성 성분을 추출하고 5%-perchloric acid로 RNA와 DNA를 순차적으로 추출하였다. DNA 함량은 Burton의 방법에 따라 diphenylamine법으로 발색시킨 후 spectrophotometer를 사용하여 정량하였다.

2) Fiber 함량분석

DNA를 추출한 잔사에 N-NH₄OH를 가하여 50℃에서 30분간 반복 처리하여 단백질을 추출하고 남은 성분을 100℃의 증류수로 2회 세척한 후 건조, 평량하여 섬유질로 하였다.

3) 당 및 유기산 분석

유리 당 및 유기산은 HPLC(LC-10AT, Shimadzu)를 사용하여 분석하였으며 HPLC의 분석 조건은 아래와 같다.

① 당 column: μ -Bondapak C18, 4.6×250mm(Waters Co), solvent: 0.1% H₃PO₄, column temp.: 30℃, flow rate: 0.5ml/min, detector: UV detector, 210nm, injection volume: 20 μ l

② 유기산 column: Spherisorb S10 NH₂, 4.6×250mm(Waters Co.), solvent: acetonitrile/water(80/20, v/v), column temp. 30℃, flow rate: 1.0ml/min,

나. 결과

1) 겔의 성장변화

발효과정 중 겔의 중량, 건조중량 및 섬유질량을 측정된 결과 Fig. 14와 같이 겔의 건조중량은 전체중량(wet)의 3%로 발효 전과정을 통하여 거의 일정하였다. 그러나 겔 중 섬유질이 차지하는 비율은 발효초기의 약 57%로부터 서서히 증가하여 발효 14일에는 97.9%에 달하였다. 즉, 발효기간에 비례하여 겔의 섬유화가 진행되었다.

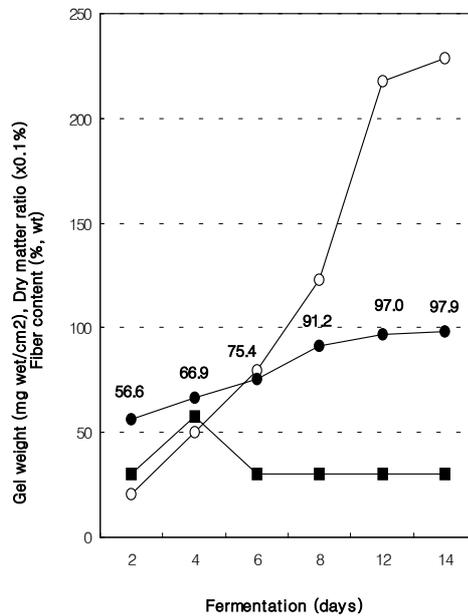


Fig. 14. Increase in fiber content of the gel according to proceedings of the fermentation

The ratio of dry gel weight against wet gel was almost constant during the fermentation for 14 days, while fiber content was succeedingly increased. Symbols are -○-: gel weight(wet), -■-: dry matter ratio -●-: fiber content

2) 겔중 DNA 함량변화

발효과정 중 겔에 함유된 DNA 함량을 분석한 결과 Table 10과 같이 발효 2~4일 사이에 급격히 증가되어 24.7 μ g/plate에 달하였다. 이 후로도 발효 12일까지 계속적으로 증가되어 12일째에는 최고함량인 46.1 μ g/plate에 달하였으나 증가속도는 점차 저하되었으며 이 후로는 감소되었다. 한편, 겔중량은 발효 전 기간을 통하여 계속적으로 증가되었으며, 겔 중량에 대한 DNA 함량은 발효 4일 이 후 계속적으로 감소되는 경향이였다.

이 결과는 겔이 두꺼워지고 중량이 늘어나더라도 발효균의 수가 늘어나는 것은 아님을 나타내는 것으로서, 대장균의 DNA 함량을 기준으로 평가했을 때 겔 내부에 부착된 발효균의 수는 약 6.4×10^9 cells/cm²로 추정되었다.

Table 10. Changes in DNA content of the gel according to the ages

Fermentation (days)	Gel weight (mg wet/plate)	DNA content (μ g/plate)	Ratio (DNA μ g/100mg gel)
2	64.4	1.2	1.9
4	157.9	24.7	15.6
6	249.9	32.1	12.9
8	385.0	42.0	10.9
10	535.7	44.8	8.4
12	686.1	46.1	6.7
14	731.9	42.9	5.9
16	764.0	35.8	4.6

DNA was extracted for 15min at 100°C with 5% perchloric acid, after fractionation of the gel component by modified STS method and DNA content was assayed according to Burton's method.

3) 발효액의 정상변화

14일간 발효한 발효액으로부터 Table 11과 같이 총 12.6%의 잔당과 2.95%의 유기산이 검출되었다. 당류 중 glucose와 maltose 함량은 발효개시 시와 큰 변화가 없었으나, sucrose 함량이 51.6mg/ml로부터 21.8mg/ml로 감소된 반면에 fructose 함량이 30.6 mg/ml로부터 48.7mg/ml로 증가 되었고 원래의 배지에는 없었던 sorbitol이 17.5mg/ml가 검출되었다. Sorbitol의 생성은 젤합성과 연계될 수도 있는 중요한 사안으로서 면밀한 검토를 필요로 하고 있다. 한편, 유기산류는 citric acid를 위시한 대부분의 산류의 함량에 변화가 없었으나, acetic acid와 oxalic acid 함량이 증가되었다.

Table 11. HPLC analysis of sugar and organic acid contents in the cultural broth fermented for 14 days

Sugar			Organic acid		
Sugars	Content(mg/ml)		Acids	Content(mg/ml)	
Fructose	48.66±1.69 ¹⁾	(30.64) ²⁾	Oxalic	1.12±0.17	(0.37)
Glucose	28.19±1.40	(23.10)	Malic	1.22±0.16	(1.77)
Sucrose	21.83±0.80	(51.56)	Ascorbic	0.20±0.00	(0.23)
Maltose	10.31±0.25	(10.66)	Acetic	9.23±0.31	(0.12)
Sorbitol	17.49±0.61	(0)	Citric	14.15±0.15	(13.81)
			Succinic	3.59±0.09	(3.63)
			Lactic	0	(0)
Total	126.48±1.20	(115.96)	Total	29.50±0.46	(28.16)

Sugars and organic acids were analysed by using a HPLC (LC-10AT, Shimadzu Co.) after fermentation for 14 days. Operation conditions of the instrument were as described in the Methods

¹⁾ Values are mean±S.D.

²⁾ Values in the parenthesis were analysed at 0 time for comparison.

6. 겔의 성상

가. 재료 및 방법

1) 물리적 성상 분석

Rheometer(Compac-100, Sun Scientific)와 색차계(JS-555, Minolta)를 사용하여 겔의 물리적 성상과 color value를 측정하였으며 rheometer의 측정조건은 아래와 같다.

Sample height: 15mm, Sample speed: 90mm/min, Table speed: 200mm,
Weight of load cell: 1kg, Sample area: 30×30mm

2) 가수분해

정제한 겔시료 10mg에 6N-H₂SO₄ 0.5ml 및 약간의 촉매를 가하고 감압 밀봉하여 130℃에서 24시간 가수분해하였다. 촉매로는 황색 HgO를 사용하였다. 가수분해 후 6N-NaOH로 중화하고 분해액 중 유리당 함량을 측정하여 분해율을 구하였다.

3) 효소분해

Peter의 방법에 따라 정제한 겔시료 10mg에 완충용액 2ml와 효소액 1ml를 가하고 40℃에서 30분간 반응시킨 후 1% salicylic acid 용액 2ml를 가하여 반응을 정지시키고 100℃에서 5분간 가열하였다. 효소액은 ml당 각각 100unit의 α- 및 β-amylase를 함유하였으며, 완충용액으로 α-amylase는 0.02M sodium phosphate buffer(pH 6.9)를 사용하였고 β-amylase는 0.016M acetate buffer(pH 4.8)를 사용하였다. 효소표품은 純正化學(α-amylase)과 東京化成(soybean, β-amylase)에서 구입하였다.

4) Fiber 함량

Schneider 등의 방법에 따라 동결건조한 겔 100mg에 5%-trichloacetic acid 5ml를 가하고 실온에서 15분간 방치하여 산 가용성 성분을 추출한 후 diethyl ether-alcohol(50:50)로 50℃에서 지질을 추출하였다. 이 과정을 2회 반복한 후 0.3N-KOH 5ml를 가하여 37℃에서 alkali 가용성 성분을 추출하고 5%-perchloric acid로 RNA와 DNA를 순차적으로 추출하였다. 잔사에 N-NH₄OH를 가하여 50℃에서 30분간 반복 처리하여 단백질을 추출하고 남은 성분을 100℃의 증류수로 2회 세척한 후 건조, 평량하여 섬유질로 하였다.

5) 구조 관찰

광학현미경용으로는 mixer기로 파쇄한 껌을 slide glass에 부착하고 crystal violet로 염색한 후 α -cellulose(Sigma)와 대비 관찰하였으며, 전자현미경용으로는 정제하지 아니한 껌과 N-NaOH로 100℃에서 30분간 3회 반복 가열하여 정제한 껌을 대비하였다.

6) 내 용해성

Glass 원심 tube에 껌 10mg과 용매 5ml를 넣고 50℃의 항온수조에서 1시간 동안 방치한 후 3,000rpm에서 원심분리하여 상층액을 제거하고 증류수로 수세한 후 105℃에서 건조, 평량하여 용해율을 구하였다. .

7) 원소분석

정제 껌을 이용하여 원소분석기(Vario EL, Elementar) 구성 원소를 분석하였다.

나. 결과

1) 일반성분

껌은 Table 1.2와 같이 97.5%의 수분을 함유하였으며 고형분의 80% 이상이 섬유질로 구성되었다. 지질과 단백질함량은 도합 2.5% 미만이었으며 무기질 함량도 0.026%로 매우 낮았다.

Table 12. Principle composition of citrus gel fermented by *G. hansenii* TL-2C

Components	Content
Moisture (%)	97.5±1.1
Crude lipid (dry %)	0.47±0.09
Crude protein (dry %)	2.0±0.9
Ashes (dry %)	0.026±0.017
Polymer (dry %)	80.2±4.6

The gel was fermented for 14 days at 30°C by using 100% citrus juice. Values are mean±S.D.(n=5)

2) 물성

감귤과즙에서 생산된 겔은 Table 13과 같이 strength $2.52 \times 10^5 \text{ dyne/cm}^2$, hardness $8.55 \times 10^5 \text{ dyne/cm}^2$ 로 질긴 성상을 나타내었으나, coconut juice나 홍차 추출물을 원료로 발효한 경우에 비해서는 부드러운 편이었으며 점착성이 높았다.

Hunter의 color value는 Table 14와 같이 L-value가 60.28로 매우 높은 반면에 a- 및 b-value가 낮은 순 백색을 나타내었다. 감귤겔의 백색도는 coconut juice나 홍차추출물에 배양한 경우보다 유의적으로 높았다.

Table 13. Rheology data of produced gel concerning with the raw materials for fermentation

Parameters	Gel produced from		
	Citrus juice	Coconut juice	Black tea
Strength (10^5 dyne/cm ²)	2.52±0.10 ^{b)}	18.78±5.45 ^{a)}	15.69±0.05 ^{a)}
Hardness (10^5 dyne/cm ²)	8.55±1.79 ^{b)}	13.73±2.63 ^{ab)}	25.90±8.05 ^{a)}
Cohesiveness (%)	44.0±15.3 ^{a)}	44.1±11.5 ^{a)}	12.6±2.6 ^{b)}
Springness (%)	48.3±1.8 ^{ns}	61.5±21.0 ^{ns}	63.3±15.4 ^{ns}
Gumminess (g)	352.2±109.4 ^{ns}	201.3±14.4 ^{ns}	156.6±50.8 ^{ns}
Brittleness (g)	168.7±58.5 ^{ns}	229.3±97.5 ^{ns}	94.3±16.9 ^{ns}

Values were measure by using a rheometer(Compac-100, Sun Scientific).

Values are mean±SD(n=7-10) and those with different superscriptions are significantly different at p<0.05. ns: not significant.

Table 14. Hunter's color value of the gels produced from different juice resources

Parameter	Gels produced from		
	Citrus juice	Black tea	Coconut juice
L-value	60.28±1.34 ^{a)}	44.16±7.42 ^{b)}	24.83±0.55 ^{c)}
a-	-1.92±0.06 ^{b)}	-1.37±0.71 ^{b)}	-8.40±0.25 ^{a)}
b-	-7.30±0.03 ^{c)}	2.82±0.53 ^{a)}	-2.01±0.18 ^{b)}

A colorimeter(JS-555, Minolta) was used for color evaluation.

Values are mean±SD(n=10) and those with different superscriptions are significantly different at p<0.05.

3) 구조

겔은 광학현미경 하에서 Fig. 15-A와 같이 완전한 섬유상 구조를 나타내었다. Fiber는 직경 약 $0.1\mu\text{m}$ 로서 대비로 사용한 α -cellulose(15-B)에 비하여 현저히 미세하였다. 전자현미경 하에서는 정제하지 아니한 겔(15-C)은 fiber들이 엉기어 fiber 사이에 공간이 없었으나 정제한 겔(15-D)은 다공성의 섬유질 상을 나타내었다.

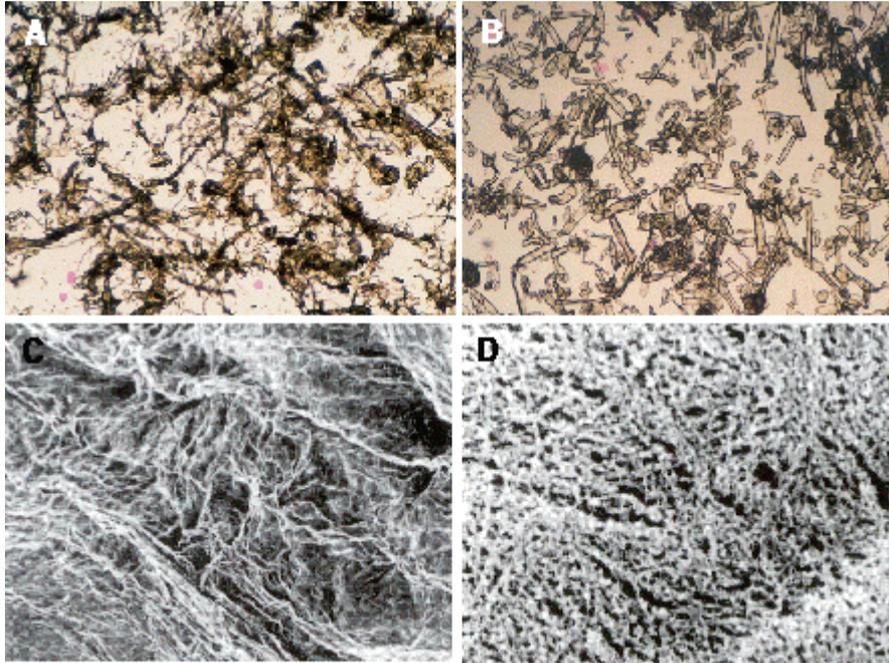


Fig. 15. Fibrous structure of the gel fermented from citrus juice

Row gel(plate A) show fibrous structure. Approximate diameter of fiber of the gel was $0.1\mu\text{m}$, while that of α -cellulose(B) was $30\mu\text{m}$. Raw gel(C) show little porous, while purified gel show porous structure. Photographs were taken with a light microscope(A and B) and a scanning electron microscope(C and D).

4) 내 소화성 및 화학적 안정성

겔은 Table 15와 같이 α - 및 β -amylase에 의하여 분해되지 아니하였으며 겔은 Table 16과 같이 통상의 산 가수분해조건 보다 가혹한 여건에서도 7.5%의 낮은 분해율을 나타내었을 뿐만 아니라 Table 17과 같이 통상의 가수분해에 사용되는 산, 알칼리에 의하여는 분해되지 아니하였다. 겔은 Table 18로 표시한 모든 용매류에 하여도 90% 이상의 회수율을 나타내었다.

Table 15. Resistance of the gel against enzymic digestion by α - and β -amylase

Enzyme system	Sample	Free sugar* ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Hydrolysis (%)
α -Amylase	Starch	155.2 \pm 21.8	15.6
	Gel	0	0
β -Amylase	Starch	377.0 \pm 29.5	37.7
	Gel	0	0
α + β -Amylase	Starch	376.8 \pm 30.7	37.7
	Gel	0	0

Samples were digested for 10 min. at 40°C. Reaction mixture was consisted of sample 10mg, buffer solution 2ml and enzyme solution 1ml.

The enzyme solution contained 100unit/ml of enzyme.

*Free sugar content was represented as the content of glucose for α -amylase and maltose for β -amylase and α + β -amylase.

Values are mean \pm S.D.(n=5)

Table 16. Hydrolysis rate of the gel against acids and alkalis

Acid & alkali	Released reducing sugar (glucose $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Hydrolysis rate (%)
3N-H ₂ SO ₄	13.8±1.8	6.9
6N-H ₂ SO ₄	14.9±2.3	7.5
6N-HCl	2.8±0.3	0.1
3N-KOH	0.1±0.3	0
3N-NaOH	16.0±1.8	8.0

Gels were hydrolysed in a vacuum sealed glass tube for 24 hours at 130°C

Table 17. List of solvents tested to solve the gel

Acid & alkali	Ether	Tetrachloroethylene
Acetic acid	<i>iso</i> -Amyl acetate	1,1,2-Trichloro-trifluoroethane
Benzoic acid	<i>t</i> -Butyl methyl ether	
Butyric acid	Ethyl methyl ether	
Formic acid	Diethyl ether	Solvent
Hydrochloric acid	Methyl cellosolve	Acetone
Nitric acid	2-Ethoxyethyl ether	Acetonitrile
Perhydrochloric acid	Butyl acetate	Benzonitrile
Sulfuric acid	Ethyl acetate	Carbon disulfide
Trichloroacetic acid	2-Methoxyethyl acetate	Cyclohexanone
Trifluoroacetic acid		N,N-Dimethylacetamide
Ammonium hydroxide	Hydrocarbon	Dimethylformamide
Sodium hydroxide	Benzene	1,4-Dioxane
Potassium hydroxide	Cyclohexane	Hydrazine
	Cyclopentane	Methyl- <i>iso</i> -butyl ketone
Alcohol	Heptane	4-Methyl-2-pentanone
<i>iso</i> -Amyl alcohol	Hexane	2-Methyl pyridine
Benzyl alcohol	2-Methylbutane	(α -Picolin)
1-Butanol	Pentane	1-Methyl-2-pyrrolidinone
Cyclohexanol	Toluene	Dimethylsulfoxide
Ethanol	2,2,4-Trimethyl pentane	Nitromethane
Ethylene glycol	<i>o,m,p</i> -Xylene	3-Pentanone
Propanol		Propylene oxide
<i>iso</i> -Propanol	Halide	Pyridine
Pentanol	Carbon tetrachloride	Ligroin(Solvent naphtha)
Methanol	Chlorobenzene	Sodium hypochlorite
Hexanol	1-Chlorobutane	Tetrahydrofuran
Phenol	Chloroform	
2-Methoxyethanol	1,2-Dichlorobenzene	Mixed
2-Methyl-1-propanol	1,2-Dichloroethane	Phenol-Trichloroethane
2-Methyl-2-propanol	Dichloromethane	(60:40)
1-Pentanol	1,1,2,2-Tetrachloroethane	1,3,5-Trichlorobenzene-
2-Pentanol	1,3,5-Trichlorobenzene	Ethyl ether(10:90)
1-Octanol	1,1,1-Trichloroethane	
Polyethylene glycol	Trichloromethane	<i>p</i> -Cresol-NaOH(0.1N)
	Tetrachloromethane	(10:90)

5) 겔 구성원소

원소분석기로 겔의 구성원소를 분석한 결과 Table 19와 같이 N, C, S, H, O의 5종의 원소만 검출되었으며, 그 중에서도 N과 S는 그 함량이 미미하였다. 주된 구성 성분은 C, H, O로서 CH₂O의 실험식을 가지는 것으로 판정되었다.

Table 19. Molecular ratio of the element which compose the gel

Element	Content(%)	Molar ratio	
		(%/MW)	relative
N	0.052	-	-
C	41.950	3.496	1.096
S	0.326	0.010	-
H	6.685	6.685	2.098
O*	50.987	3.187	1.000

Element was analysed by using an analyser(Vario EL, Elementar).

*Oxygen content was estimated as 100%-sum of other element.

7. 동물사육

가. 재료 및 방법

1) 식이섬유 제조

겔 발효: 실험식이에 섬유소원으로 사용할 bacterial fiber(이하 BF로 약함)를 제조할 목적으로 4각형 FRP bad (W40×L70×H21cm)에 12cm 높이로 배지를 충전(충진량 34L)하고 발 *G. hansenii* TL-2 및 TL-2C를 사용하여 30℃의 배양실에서 14~18일간 정지배양하여 겔을 생산하였다. 배양에 사용한 배지의 조성은 Table 20과 같다. 생산된 겔은 생산된 겔을 흐르는 물로 2시간 세척하여 산 및 이물질을 제거한 후 동결저장하였다. 일부의 겔은 코코넛과즙을 원료로 발효되었으며 감귤과즙에서 생산된 겔과 혼합가공 하였다.

식이섬유 제조: 겔을 해동 후 유압식 압착기(경북과학대학 부설 식품공장, 경북 칠곡군)로 40Kg/cm²에서 압착하여 탈수하였으며, 동결건조(해농식품, 경북 포항시)한 다음 파쇄하여 60mesh의 건조분말로 제조하였다.

Table 20. Composition of cultural medium for pilot production of gel by *G. hansenii* TL-2 and TL-2C

Nutrient	Content	Remarks
Citrus juice	10ml	concentrate
Refined white sugar	90~95g	adjusted to 10°Brix
Spirit(95% ethanol)	10ml	
Distilled water	1L	

pH of the cultural broth was adjusted to 3.0 by using 0.1N-acetic acid
Gel thick as 12~16mm was produced by static culture of inoculated medium for 14~18 days at 30℃.

2) 실험동물

체중 320 ± 10 g 전후의 Sprague-Dawley 종 숫컷을 대한 실험동물 센터로부터 구입하여 사용하였다.

3) 식이제조용 사료물질 및 분석시약

실험에 필요한 식이성분 중 casein, cholesterol, mineral mix, vitamin mix.는 Teklad 사(Madison, Wisconsin, USA)에서 구입하였고 cellulose와 pectin은 Simga사 (St. Louis, MO, USA), 옥수수 전분은 삼양사, 설탕, 라아드, 대두유는 시중에서 구입하였다. 지질 분석 Kit 시약은 아산제약 및 Sigma사에서 구입하였고, 유기용매는 Merck사에서, 일반시약은 특급을 사용하였다.

4) 식이제조

AIN-76을 기준으로 0.5%의 콜레스테롤을 첨가한 고 콜레스테롤 식이를 제조하였으며, 식이의 조성은 Table 21과 같다. 총 식이 종류는 6종으로 3종의 섬유소 즉, cellulose(C), pectin(P), bacterial fiber(BF)를 각각 1%와 2%(w/w) 수준으로 첨가하였으며 동물도 이 식이에 따라 6군으로 구성되었다.

Table 21. Compositions of experimental diets

(unit: g/100g)

Ingredients	Experimental groups ¹⁾					
	C1	C2	P1	P2	BF1	BF2
Casein	15	15	15	15	15	15
Corn starch	51	51	51	51	51	51
Sucrose	15	15	15	15	15	15
Lard	4	4	4	4	4	4
Soy oil	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
Mineral mix.	4	4	4	4	4	4
Vitamin mix.	1	1	1	1	1	1
Cholesterol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Fiber ²⁾	1	2	1	2	1	2

¹⁾C: cellulose, P: pectin, BF: bacterial fiber

²⁾Types of fiber are matched with the names of groups; C1 and C2 fed cellulose as fiber, P1 and P2, pectin and BF1 and BF2, dry powder of bacterial fiber produced as described in the Methode.

5) 동물사육

실험동물을 일주일 동안 일반 고품 배합사료를 섭취시켜 새로운 환경에 적응케 한 후에 실험군 별로 체중이 유사한 9~10 마리씩 배당하였다. 사육실 온도는 24±1℃를 유지 하였으며, 명암은 12시간 간격으로 점등 및 자동 소등하는 조건에서 사육하였다. 실험식은 1% pectin 식이군에 대하여 나머지 5군을 pair-fed하여 4 주간 지속되었고, 식이기간 내에 물은 자유로이 섭취하게 하였다. 식이기간 동안 식이 섭취량은 2 일 간격으로, 체중은 3일 간격으로 측정하였으며, 분변은 4주간의 식이를 마치고 희생 하기 전 4일 동안 매일 수거하여 분석 전까지 -20℃에서 보관하였다.

6) 분석시료 준비

- ① 혈장: 희생 전 12~13시간 절식 시킨 후 ether로 가볍게 마취하고 개복하여 복부 대동맥에서 혈액을 채취하였으며, 2500rpm에서 15분간 혈장을 분리하여 냉동

보관하였다.

② 간 조직: 절취한 간을 0.9% saline으로 세척하여 거제로 수분을 제거 한 후 무게를 측정하고 액체질소로 냉각 시킨 알루미늄 크래프트로 눌러 급속 동결 시켰으며 -50°C 에 보관하였다.

③ 분변: 희생하기 4일 전 매일 일정한 시간에 변을 수거하였으며 분석시 까지 -50°C 에 냉동 보관하였다.

④ 소장: 소장은 Treitz 인대로부터 맹장 연결부분까지 잘라 길이를 측정 한후, 1/3 지점에서 5cm조각을 잘라 두 개의 slide glass 사이에서 점막을 긁어내어 점막의 무게를 측정하였으며 -50°C 에 냉동 보관 하였다.

7) 분석

① 혈장과 간 조직의 지질 분석

혈장의 총 콜레스테롤, HDL-cholesterol 및 triglyceride는 효소법에 의한 kit(아산제약)를 사용하여 각각 500 및 550nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 계산하였다. 간 조직의 지질은 Folch 등의 방법으로 추출하였으며, 콜레스테롤은 Pearson 등의 방법에 따라 정량하였고, triglycerides는 Sale 등의 방법에 따라 chloroform에 용해된 지질 추출물 일정량 취한 후 N_2 gas로 건조시킨 후 Triton X-100 와 ethanol 에 용해시키고 효소법에 의한 kit(아산제약)를 사용하여 정량 하였다.

② 소장 점막의 이당류 가수분해 효소활성 측정

절취한 소장 점막시료를 실온에서 해동 시킨 후 증류수를 20배 첨가하여 homogenizer로 균질화 한 후 일정량을 취해 증류수로 각각 30배, 210배 희석 한 것을 시료로 하였다.

Dahlqvist 등의 방법에 따라 maltose와 sucrose를 기질로 하여, 이당류 가수분해 효소인 maltase 와 sucrase활성을 각각 정량하였다. 즉, 효소반응에 의해 생성된 glucose를 glucose oxidase로 산화시켜, gluconic acid와 H_2O_2 로 전환 시킨후, peroxidase로 반응시켜 450nm에서 발색되는 정도를 측정하였다. 이당류 가수분해 효소의 활성은 1분 동안 효소에 의해 생성된 glucose $1\mu\text{mole}$ 를 1unit로 하였으며, units/mg protein(specific activity)으로 나타내었다.

③ 단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin을 표준품을 사용하여 Biuret법으로 정량하였다.

4) 변의 지질 분석

실험식이 4주 중 마지막 4일 동안 수거하여 냉동 보관하였던 변을 -70°C 에서 항량에 도달할 때까지 냉동건조하고 평량하였다. 건조분변 200mg을 취하여 곱게 분쇄한 뒤 Deweal 등의 방법에 의해 변의 지질과 담즙산을 추출하였다. 즉, 분쇄된 건조 변에 4% KOH 용액을 1ml를 넣어 120°C 에서 3시간 autoclave한 다음 20% NaCl 용액 1ml를 첨가하고 에테르 20ml로 2회 추출하여 이 추출액에서 분변의 콜레스테롤 함량을 간조직에서와 같은 방법으로 측정하였다. 에테르로 추출하고 남은 하층액에 c-HCl 0.2ml와 에테르를 20ml 씩 가하여 4회 추출하였다. 수집한 추출액을 rotary evaporator를 이용하여 감압 농축시킨 후 건조시키고 다시 MeOH : H₂O (5:1,v/v) 혼합액에 용해시켰다. 이 혼액의 일정량을 담즙산의 시료로 사용하였으며 담즙산 함량은 kit시약(Sigma사)을 이용하여 530nm에서 분석하였다.

5. 통계분석

실험결과는 평균치와 표준 오차를 산출하였으며, 각 실험치 간의 검증은 SAS를 이용한 Anova와 Duncan's multiple range test 에 의하여 $P < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

나. 결과

1) 체중 증가량, 식이 섭취량, 식이효율

각 군별 실험 시작시의 체중, 종료시의 체중, 식이섭취량, 식이효율은 Table 22와 같다. 즉, 체중은 식이 1%수준에서는 cellulose 및 pectin 첨가군에 비해 bacterial fiber 군에서 다소 증가되었으나 식이 2% 수준에서는 유의적인 차이가 없었다. 식이 섭취량은 pectin 1% 군을 대조로 하여 다른 군들에 대해 pair-fed하였으므로 모든 실험군 간에 차이가 없었고, 식이효율은 섬유소 1% 수준에서는 bacterial fiber (BF1)군에서 유의적으로 높았으나 섬유소 2%수준에서는 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다.

Table 22. Initial weights, final weights, body weight gains and food efficiency of rats fed three different dietary fibers for 4 weeks

Diet group	Initial weight (g)	Final weight (g)	Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency (g/100g diet)
C1	321.9±6.4	418.6±8.6	3.5±0.3 ^{b)}	20.2±2.7 ^{ns}	16.4±1.5 ^{b)}
P1	310.8±13.3	410.7±28.3	3.6±1.0 ^{b)}	20.9±2.2	16.9±3.8 ^{b)}
BF1	324.3±13.9	441.9±15.3	4.2±0.4 ^{a)}	19.5±1.5	21.6±1.9 ^{a)}
C2	317.2±14.4	434.6±18.7	4.2±0.4 ^{ns}	21.9±0.6 ^{ns}	19.2±1.8 ^{ns}
P2	309.0±14.8	423.4±28.5	4.1±0.8	21.3±2.3	19.0±1.9
BF2	324.7±11.5	436.3±19.3	4.0±0.5	21.5±0.9	18.5±1.9

Values are mean±S.D. of 9-10 rats per group and those in the same column with the same dietary fiber level not sharing the common superscript letters were significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

ns: not significant, C: cellulose P: pectin BF: bacterial fiber

1: 1% of each fiber in diet and 2: 2% of each fiber in diet.

2) 간 조직 중량

간 조직의 중량은 Table 23과 같이 1% 수준에서는 Pectin 군이 다른 군들보다 유의하게 낮았으나, 2% 수준에서는 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 체중에 대한 백분율로 환산하였을 때에도 군간의 차이는 없었다.

Table 23. Liver weights of the rats fed three different dietary fibers for 4 weeks

Diet group	Liver	
	Weight (g)	Relative weight (g%/body weight)
C1	14.2±1.2 ^{ab)}	3.4±0.2 ^{ns}
P1	13.2±2.1 ^{b)}	3.2±0.3
BF1	15.3±1.5 ^{a)}	3.5±0.4
C2	15.4±1.1 ^{ns}	3.5±0.3 ^{ns}
P2	15.0±2.1	3.5±0.5
BF2	14.9±1.2	3.4±0.3

Values are mean±S.D. of 9-10 rats per group and those in the same column with the same dietary fiber level not sharing the common superscript letters were significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

ns: not significant, C: cellulose P: pectin BF: bacterial fiber
1: 1% of each fiber in diet and 2: 2% of each fiber in diet.

3) 혈장 지질 수준

Fig. 16은 식이섬유소의 종류와 수준을 달리한 실험군들의 혈장 총 cholesterol, HDL-cholesterol의 농도를 나타낸 것이다. 총 콜레스테롤 농도는 섬유소 1% 수준에

서는 군간에 유의적인 차이가 없었으나, 2% 수준에서 pectin군이 유의하게 낮았다. HDL-cholesterol 농도에서는 두 수준 모두에서 bacterial fiber (BF)군이 낮은 경향이 있었으나 유의적인 차이는 없었다.

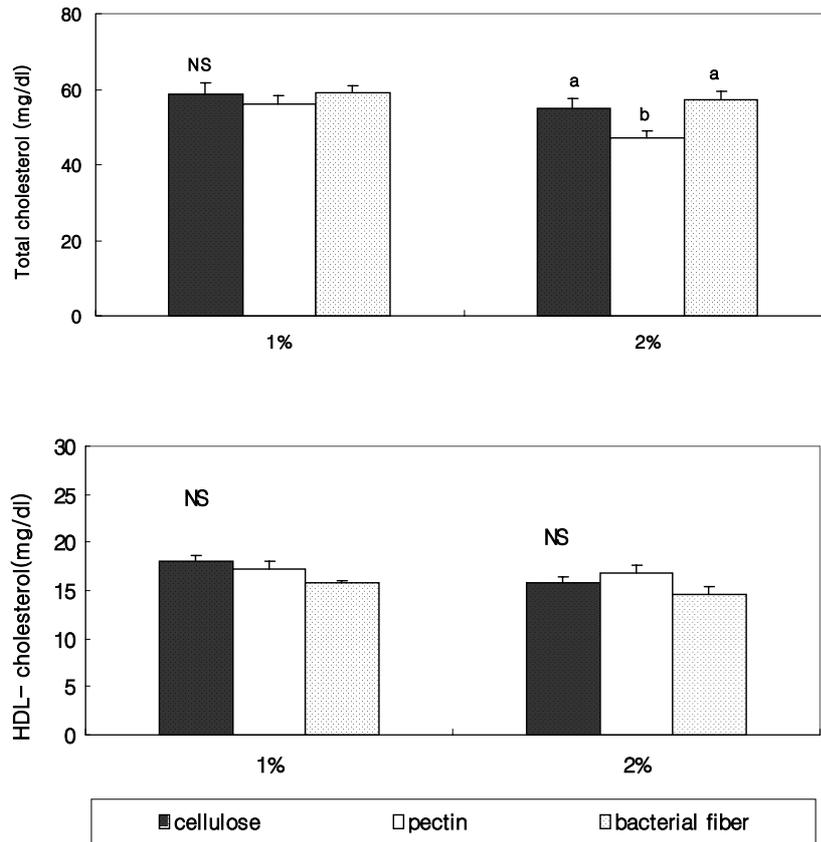


Fig. 16. Plasma levels of total and HDL-cholesterol of rats fed three different dietary fibers at 1% and 2%(w/w) in diet for 4 weeks

Values are mean±S.E. of 9-10 rats and those with the different subscriptions within same box were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. ns: not significant.

중성지방 함량은 Fig. 17과 같이 식이 섬유소 1% 수준에서는 bacterial fiber군이

다른 군들보다 유의적으로 낮지만, 2% 수준에서는 군간에 유의적인 차이가 없었다. 식이 섬유소 1% 수준과 2%수준을 통합하여 식이 섬유소의 종류별 수준만을 비교하면 Fig. 18과 같이 총 콜레스테롤농도는 pectin군이 유의하게 낮았고, 중성지질 함량은 BF군이 유의하게 낮았다. HDL-cholesterol농도는 pectin군이 유의하게 높았다.

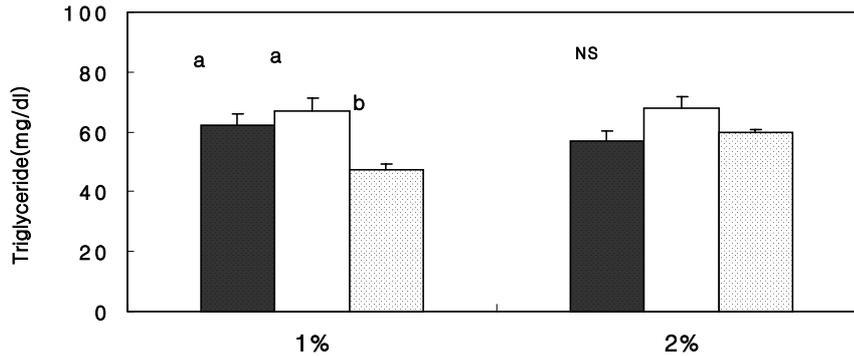


Fig. 17. Plasma levels of triglyceride of rats fed three different dietary fibers at 1% and 2%(w/w) in diet for 4 weeks

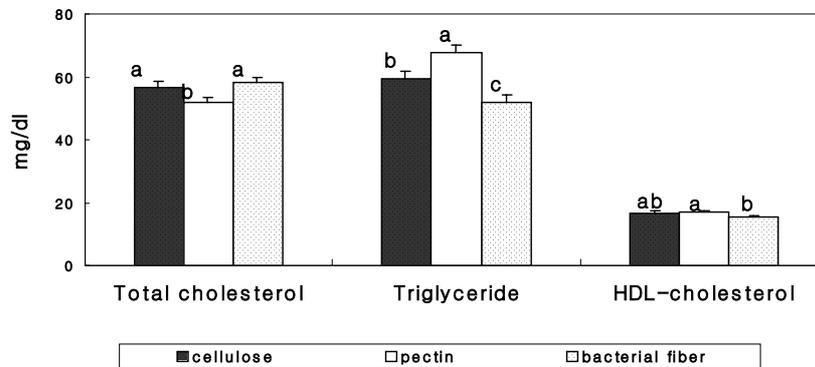


Fig. 18. Summary of plasma lipid levels of rats fed three different dietary fibers in diet for 4 weeks

Values are mean±S.E. of 9-10 rats and those with the different subscriptions within same box were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. ns: not significant.

4) 간 조직의 지질 수준

간 조직의 지질 함량은 Fig. 19와 같다. 간의 cholesterol 농도는 pectin군이 두 수준에서 모두 유의적으로 감소되었다. 중성지질 함량은 식이섬유소 1% 수준에서는 군간 유의적인 차이가 없었으나, 2% 수준에서는 bacterial fiber군이 유의적으로 낮았다.

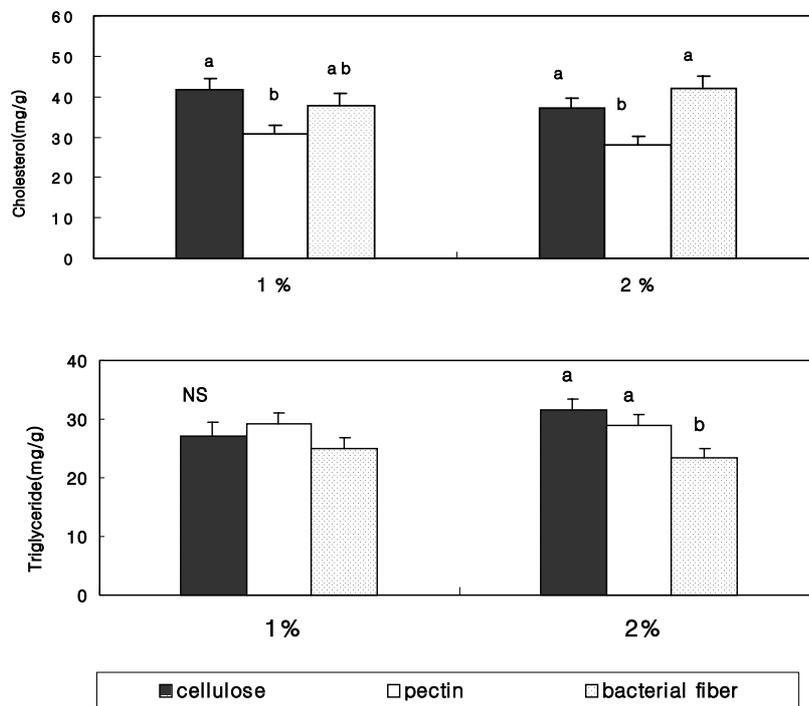


Fig. 19. Liver levels of cholesterol, triglyceride of rats fed three different dietary fibers at 1% and 2%(w/w) in diet for 4 weeks

Values are mean±S.E. of 9-10 rats and those with the different subscriptions within same box were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. ns: not significant.

Fig. 20은 식이 섬유소 1% 수준과 2% 수준을 통합하여 식이 섬유소의 종류별 수준만을 비교한 것이다. 콜레스테롤 농도는 pectin군이 유의하게 낮았고, 중성 지방농도에서는 bacterial fiber군이 유의하게 낮았다.

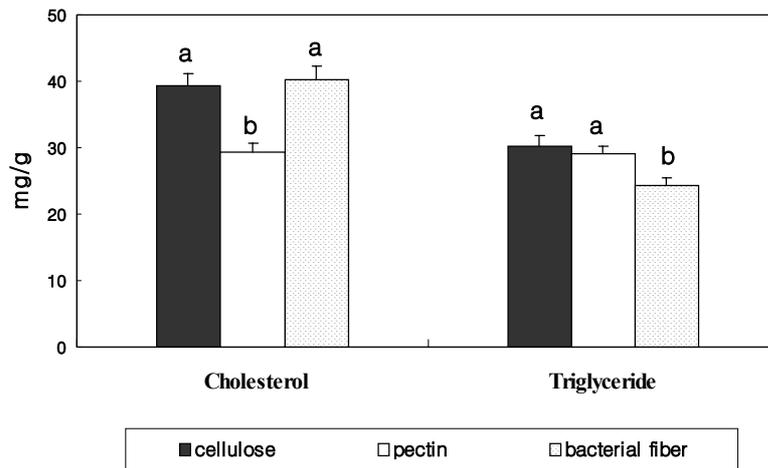


Fig. 20. Summary of liver lipid levels of rats fed three different dietary fibers in diet for 4 weeks

Values are mean±S.E. of 9-10 rats and those with the different subscriptions within same box were significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. ns: not significant.

5) 소장 크기 및 효소 활성

Table 24는 식이수준을 달리하였을 때 소장 길이, 소장 무게, 체중에 대한 소장의 중량비를 나타낸 것이다. 소장의 길이는 두 수준 모두 유의적인 차이는 없었으나, bacterial fiber군이 높은 경향이였다. 무게는 1%수준에서는 pectin군, 2%수준에서는 bacterial fiber군이 높은 경향이였다. 체중에 대한 비 역시 두 수준에서 pectin군이 높은 경향이였으나 군간에 유의적인 차이는 없었다. 소장 점막의 sucrase 및 maltase 활성을 검정한 결과도 Table 25와 같이 군간에 유의적인 차이가 없었다.

Table 24. Small intestine length, weights and relative weights of rats fed three different dietary fibers for 4 weeks

Diet group	Small intestine		
	Length (cm)	Weight (g)	Relative weight (%BW)
C1	94.0±14.1 ^{ns}	7.54±1.1 ^{ns}	1.83±0.3 ^{ns}
P1	95.2±6.9	8.31±2.0	2.03±0.5
BF1	101.2±9.3	7.93±1.7	1.79±0.4
C2	97.1±7.8 ^{ns}	7.42±0.9 ^{ns}	1.73±0.2 ^{ns}
P2	96.5±9.7	8.09±1.1	1.94±0.3
BF2	100.3±2.6	8.23±1.3	1.87±0.3

Values are mean±S.D. of 9-10 rats per group and those in the same column with the same dietary fiber level not sharing the common superscript letters were significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

ns: not significant. C: cellulose P: pectin BF: bacterial fiber.

1: 1% of each fiber in diet and 2: 2% of each fiber in diet.

Table 25. Disaccharidase activities of small intestinal mucosa of rats fed three different dietary fibers for 4 weeks

Dietary group	Sucrase (units/mg protein)	Maltase (units/mg protein)
C1	2.4±0.7 ^{ns}	10.2±1.0 ^{ns}
P1	2.5±0.8	8.5±0.7
BF1	2.0±0.5	9.5±1.2
C2	2.7±0.5 ^{ns}	12.4±1.3 ^{ns}
P2	2.4±0.8	11.8±1.4
BF2	2.8±0.8	10.1±0.5

Values are mean±S.D. of 9-10 rats per group and those in the same column with the same dietary fiber level not sharing the common superscript letters are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

ns: not significant. C: cellulose P: pectin BF: bacterial fiber.

1: 1% of each fiber in diet and 2: 2% of each fiber in diet.

6) 분변의 콜레스테롤 및 담즙산 배설량

Table 26에서 각 군들의 분변 건조 중량 및 콜레스테롤과 담즙산의 배설을 보여 주고 있다. 분변 건조 중량은 cellulose 섭취군이 다른 군들보다 유의하게 높았으며, pectin 1%군과 bacterial fiber 2%군이 유의하게 낮았다. 분변의 콜레스테롤과 담즙산 배설을 보여 주고 있다. 분변의 콜레스테롤 배설량은 1% 수준 및 2% 수준 모두에서 pectin군은 cellulose군과 유사하였으나 bacterial fiber군만이 유의적으로 낮았다. 그러나 담즙산 배설량은 군간에 유의적이 차이는 없었으나 bacterial fiber군에서 다소 높은 경향을 보였다.

Table 26. Fecal dry weights and excretions of cholesterol, bile acid of rats fed three different dietary fibers for 4 weeks

Diet group	Dry weights of feces (g/day)	Cholesterol (mg/day)	Bile acid (mg/day)
C1	2.0±0.08 ^{a)}	61.4±4.6 ^{a)}	7.8±0.7 ^{ns}
P1	1.6±0.07 ^{b)}	56.9±5.8 ^{ab)}	7.8±0.8
BF1	1.5±0.04 ^{a)}	46.82±3.4 ^{b)}	9.1±0.8
C2	1.8±0.05 ^{a)}	59.8±2.9 ^{a)}	6.2±0.5 ^{ns}
P2	1.6±0.08 ^{b)}	58.9±6.5 ^{a)}	5.7±0.5
BF2	1.3±0.11 ^{c)}	40.5±3.4 ^{b)}	7.0±0.9

Values are mean±S.D. of 9-10 rats per group and those in the same column with the same dietary fiber level not sharing the common superscript letters were significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

ns: not significant. C: cellulose P: pectin BF: bacterial fiber.

1: 1% of each fiber in diet and 2: 2% of each fiber in diet.

8. 겔 발효액의 항균력 시험

가. 재료 및 방법

1) 검정균

Bacillus subtilis(KCTC 1021), *Staphylococcus aureus*(KCTC 1916), *Escherichia coli*(ATCC 11105) 및 *Salmonella typhimurium*(KCTC 1916)의 4종의 세균을 검정균으로 겔 발효 후 잔액의 항균력을 검정하였다. 검정균은 한국 유전자은행으로부터 구입하였으며, *S. aureus*는 Micrococcus용 배지를 사용하여 37°C에서 배양하였고 나머지 균주는 Nutrient 배지를 사용하여 30°C 또는 37°C에서 배양하였다.

검정균은 L-자 시험관을 사용하여 3회 계대배양하고 대수증식기의 균액을 검정용으로 사용하였다.

2) 과즙 발효액

14일간의 겔 발효 후 남은 과즙배지를 membrane filter(0.45 μ m, Advantec MFS)로 여과하여 과즙 중의 미생물을 제거한 것을 시료로 사용하였다.

3) Paper disk test

검정균 배양용 고체배지를 도말한 Petri dish를 무균상 내에서 24시간 방치하여 과잉의 수분을 제거하고 검정균 배양액 1ml/dish를 가하여 10분간 방치하여 균체를 도말하였다. 여분의 배양액을 제거한 후 8시간 정치배양하고 배지의 표면에 paper disk를 정치하였다. Paper disk(직경 6mm, Advantec No.2)는 사용 전에 autoclave 하였으며, 과즙배지에 침지 후 여분의 배지를 제거하고 Petri dish에 정치하였다. Disk를 정치한 dish를 30°C 또는 37°C에서 48시간 정치배양하고 disk의 주변에 생성된 생육저지환(clear zone)의 직경을 측정하였다.

4) 흡광도법에 의한 생육저해 시험

내경 15mm의 L-형 시험관에 과즙을 포함한 배지 10ml를 분주하고 0.75Kg/cm²에서 10분간 살균하였다. 여기에 검정균 배양액 1ml를 접종하고 진탕배양기(HK-SIL 25C, 한국 종합기기제작소)를 사용하여 진탕(160rpm)배양 하였다. 배양과정 중 광전비색계(ANA-7A, Tokyokoden)로 660nm에서 배양액의 흡광도를 측정하였다.

나. 결과

1) Paper disk test

Gram 양성 세균인 *B. subtilis*와 *S. aureus*에서 생성된 저지환은 각각 직경 6.1mm, 7.0mm로 저지환의 면적이 넓지 아니하였으나, Gram 음성세균인 *E. coli*와 *S. typhimurium*에서는 Table 26과 같이 직경 8.0~8.5mm의 넓은 생육저지환을 형성하였다.

Table 26. Antibacterial activity of fermented broth assayed by paper disk test

Test organism	Clear zone (dia. mm)	Medium & cultural temperature
<i>Bacillus subtilis</i> (KCTC 1021)	6.1	Nutrient, 30°C
<i>Staphylococcus aureus</i> (KCTC 1916)	7.0	Micrococcus, 37°C
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11105)	8.0	Nutrient, 37°C
<i>Salmonella typhimurium</i> (KCTC 1916)	8.5	Nutrient, 37°C

Paper disk (dia. 6mm, Advantec No.2) was soaked in cultural broth in which the gels were already fermented for 14 days. After removing of excess fluid, the disk was settled on solid medium where bacterial cells were grown for 8 hours. After static cultivation for 48 hours at designated temperature, size of clear zone which formed around the disk was measured. Bacterial strains were purchased from the Korean Bank of Genetic Resources. Values are mean of 5 replications.

2) 흡광도법에 의한 증식저해

겔 배양액은 Fig. 21과 같이 시험한 모든 농도(20~100%)에서 공시균의 생육을 저해하였다.

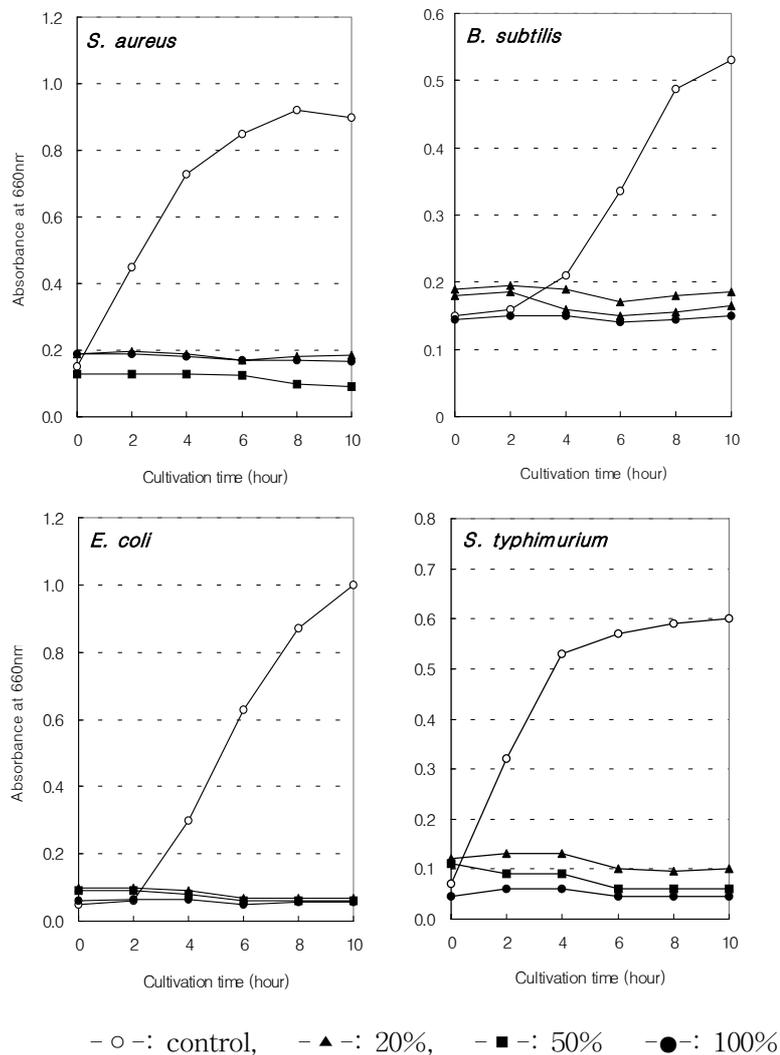


Fig. 21. Inhibitory effect of gel-fermented broth on turbidometric growth of some food born pathogenic bacteria

Actively growing cells of the test bacterium were inoculated to liquid medium containing designated concentrations of citrus juice medium in which gels had been fermented for 14 days. The liquid medium which contained remaining juice medium was autoclaved at 0.75Kg for 10 minutes before use. During cultivation of the test bacterium with vigorous shaking, turbidity of the bacterial culture was measured at 660nm. L-tubes and a shaking incubator(HB-201SF) was used for cultivation of the test bacterium.

9. 참고문헌

- 1) Choi MA, Choi KH, Kim JO. 1996. Microflora occurring in the fermentation by tea fungus. *Korean J Life Science* 6: 56-65
- 2) 최경호, 최미애, 김정옥. 1997. Tea fungus 발효홍차의 향기, *한국생명과학회지* 7: 309-315
- 3) Ko JY, Shin KS, Lee JS and Choi WY. 2002. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* GS11. *Kor J Microbiol Biotechnol* 30: 57-62
- 4) Son HJ, Lee OM, Kim YG, Park YK, and Lee SJ. 2000. Characteristics of cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in static culture. *Korea J Biotechnol Bioeng* 15:573-577
- 5) Han NS. 1995. The mechanism of *Acetobacter xylinum* in cellulose biosynthesis. *Agr Chem and Biotech* 8: 127
- 6) Ko JY, Shin KS, Yoon BD and Choi WY. 2000. Isolation and identification of *Acetobacter xylinum* GS11 Producing cellulose. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 28: 139-146
- 7) Benziman M, Haigler CH, Brown Jr, RM., White AR. and Coopr KM. 1980. Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 77: 6678-6682
- 8) Mastuoka M, Tsuchida K, Matwushita O, Adachi and Yoshinaga F. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* sub sp. *sucrofermentans*. *Biosci Biotech Biochem* 60: 575-579
- 9) Embuscado ME, BeMiler JN and Marks JS. 1996. Isolation and partial

characterization of cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Food Hydrocol* 10: 75-82

10) Okima A, Shirae H, Kano H and Yamanaka S. 1992. Bacterial cellulose 1. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*. *Food Hydrocoloids* 6: 471-477

11) Vandamme EJ, Baets SD, Vanbaelen A, Joris K and Wulf PD. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability* 59: 93-99

12) Jonas R and Farah LF. 1998. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability* 59: 101-106

13) Kuga S. 1992. Bacterial cellulose, The possibility of raw material for paper making fiber. *Kor. J. Mochae Konghak* 20: 3-8

14) Cho SH, Lee JY, Choi YS and Choi KH. 2002. Dietary effects of fiber produced from *Gluconoacetobacter hansenii* on digestive tract and lipid metabolism in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 802-807

15) Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. 2001. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci* 26: 1561-160321.

16) Kojima Y, Seto A, Tonouchi N, Tauchida T and Yoshinaga F. 1997. High rate production of bacterial cellulose in static culture strain. *Biosci Biotech Biochem* 61: 1585-1586

17) Ishikawa A, Matsuoka M, Tsuchida T and Yoshinaga F. 1995. Increase in cellulose production by sulfaguanidine-resistant mutants derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. *Biosci Biotech Biochem* 59: 2259-2262

- 18) Lee HC. 1999. Reduced production of microbial cellulose caused by aggregation of *Acetobacter xylinum* under shaking culture conditions. *Applied Chemistry* 39: 92-95
- 19) Yoshinaga F, Tonouchi N and Watanabe K. 1997. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. *Biosci Biotech Biochem* 61: 219-224
- 20) Toyosaki H, Naritomi T, Seto A, Masuoka M, Suchida T and Yoshinaga F. 1995. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. *Biosci Biotech Biochem* 59: 1489-1502
- 21) TED Case Studies. 2002. Nata de coco boom and the Philippines. BPI report. Philippines.
- 22) Choi MA, Kim JO and Choi KH. 1996. Effects of saccharides and incubation temperature on pH and total acidity of fermented black tea with tea fungus. *Kor J Food Sci Technol* 28: 405-410
- 23) Lee SP and Kim CS. 2000. Characterization of Kombucha beverages fermented with various teas and tea fungus. *Korean J Food Sci Nutr* 5(2): 165-169
- 24) Lee OS, Jang SY and Jeong YJ. 2002. Culture conditions for the production of bacterial cellulose with *Gluconacetobacter persimmonus* KJ145. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 572-577
- 25) Lee OS, Jang JY and Jeong YJ. 2003. Effect of ethanol on the production of cellulose and acetic acid by *Gluconacetobacter persimmonensis* KJ145. *J Korean Soc. Food Sci Nutr* 32: 181-184
- 26) Son HJ, Lee OM, Kim YG and Lee SJ. 2000. Isolation and identification of

cellulose-producing bacteria. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 28: 134-138

27) Ko JY, Shin KS, Lee JS and Choi WY. 2002. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* GS11. *Kor J Microbiol Biotechnol* 30: 57-62

3절. 감귤식초 및 식초산 음료개발

1. 감귤 식초발효균주 선발 및 개선

가. 재료 및 방법

감귤은 제주도산으로 제주북합가공공장에서 가공된 농축액과 2001년 12월 제주도 서귀포 일대 생산 감귤을 착즙하여 사용하였다.

1) 식초산균 분리 및 동정

가) 식초산균 분리

(1) 감귤식초발효균주 선발을 위하여 감귤시험장보유 감귤 알콜발효균주 CMY-28을 이용하여 감귤농축액과 감귤착즙액을 발효시킨 감귤와인을 30℃에서 200rpm으로 진탕배양하여 초산발효를 유도하였다.

(2) Ethanol 고체평판배지에 streaking하여 생성된 colony 주변의 clear zone의 넓이와 투명도를 기준으로 수회 분리하여 산생성능력이 뛰어난 식초산균을 분리하였다. Ethanol 고체배지 조성은 Table 1과 같다.

초산발효 30일째의 감귤농축발효액과 감귤착즙발효액을 6,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액은 버리고 가라앉은 부유물을 ethanol 고체평판배지에 streaking하여 생성된 colony를 1차 분리하였다. 1차 분리균을 streaking하여 CaCO₃를 중화시켜 colony 주변에 나타난 clear zone의 넓이와 투명도를 기준으로 산 생성능이 높은 균을 2차 선별하였으며, 같은 방법으로 수회 반복분리함으로써 산생성능이 가장 뛰어난 식초산균을 배지 종류에 따라 2종씩 분리하였다.

Table 1. Composition of ethanol medium and citrus medium

Medium	Nutition	Content (g/liter)
Ethanol	Yeast extract	10.0
	CaCO ₃	20.0
	Ethanol	20.0
	Agar	20.0
Citrus	Citrus concentration fluid	10.0
	Ethanol	50.0

Sterilized at 0.75Kg/cm² for 15minutes.

나) 현미경 관찰

광학현미경으로 분리균주의 형태를 단일염색 및 그람염색 방법으로 관찰하였다.

단일염색은 상법에 따라 균체를 crystal violet으로 1분간 염색한 후 관찰하였다.

다) 식초산균 동정

분리된 2종의 초산균 동정은 16S rDNA 유전자 분석을 하였으며, (주)마이크로아이디에 의뢰하였다. Sequence는 rRNA 이차구조를 참고하여 alignment 하여, %Similarity 값으로 나타내었다.

2) 발효 균주별 발효특성 검토

가) 발효력 검정

(1) paper disc test

분리한 2종의 식초산균의 발효력 검정은 경북과학대학에서 보유하고 있는 식초산균 3종과 비교하였으며, 각 균주를 감귤배지에 접종하여 30℃에서 5일간 배양한 후 멸균된 paper disc(직경 8mm, ADVANTEC, TOYO)에 일정량을 흡수시켜 고체 ethanol 배지를 도말한 petri dish 상면에 가볍게 고정시키고 30℃에서 3일간 정지 배양한 후 disc 주위에 생성된 clear zone의 크기로써 발효력을 비교하였다.

(2) 발효특성 실험

제주감귤시험장보유 감귤알콜발효균주 CMY-28을 접종하여 28℃에서 36시간 정치배양한 액 10%(v/v)를 주모로 사용하였으며, 종초는 알콜발효 후 감귤식초에서 분리한 초산균을 접종하고 30℃에서 200rpm으로 1주일 배양한 액 10%(v/v)를 종초로 사용하였다.

경북과학대학 보유 초산발효균 3종과 감귤에서 분리한 초산발효균 2종을 감귤농축 알콜발효액과 감귤착즙 알콜발효액에 각각 접종하여, 초기산도를 1로 조정 한 후 감귤초산발효과정의 발효특성을 관찰하였다. 각각 초산발효 중 2일 간격으로 발효액의 pH, 산도 변화를 측정하였다.

초산발효 9일째 감귤착즙·감귤농축식초를 완성품으로하여 시판되고 있는 사과식초, 감식초, 매실식초, 포도식초와 비교하여 관능검사를 실시하였고 각각의 색도차이를 비교하였다.

(가) pH 및 산도 측정

pH는 배양액을 원심분리(8,000rpm×15min)하여 균체를 제거한 후 pH meter (Methrom, model 691, Swiss)를 이용하여 측정하였다.

산도는 AOAC법에 따라 Δflask에 배양액 10ml를 취한 다음 bromothymol blue 2~3방울 넣어 0.1N NaOH로 중화적정하였으며 소요된 NaOH의 량으로부터 acetic acid 농도(% w/v)로 표시하였다.

$$\text{Total acidity (acetic acid, \% w/v)} = \frac{\text{ml of 0.1N-NaOH titrated} \times 0.006 \text{ acetic acid}}{10\text{ml}} \times 100$$

(나) 알콜함량 측정

배양액을 원심분리한 후 상징액을 증류하여 alcohol hydrometer로 측정 한 값을 Gay Lussac Table로 환산하여 계산하였다.

(다) 색도 측정

색도는 균액을 원심분리(8,000rpm×15min)하여 균체를 제거한 후 색차계 (Japan, CHROMA METER cr-301)를 이용하여 3회 반복 측정 한 후 그 평균값으로 Hunter값(L: lightness, a: redness, b: yellowness)으로 나타내었다.

(라) 관능검사

10명의 요원들로 각 식초를 2배 희석하여 관능을 실시하였다. 평가된 식초의 관능 특성은 색의 강도, 색의 기호도, 신향의 강도, 기타취의 강도, 향의 기호도, 신맛의 강도, 기타맛의 강도, 맛의 기호도, 전체적인 기호도로 5점 척도법을 이용하여 평가하였으며, 각 특성이 강할수록 높은 점수(1:매우 약하다, 매우나쁘다, 5: 매우강하다, 매우좋다)를 나타내었다.

3) 감귤 기능성 성분의 발효 단계별 이행을 분석

가) 헤스페리딘, 나린진 함량 및 유기산 함량

감귤배양액의 발효단계별 헤스페리딘, 나린진의 함량변화와 유기산 함량을 분석하였다. 분석조건은 Table 2와 같다.

Table 2. Analysis condition

	Hesperidin Naringin	Organic acid
Eluent	0.01N-H ₂ SO ₄	2.5% acetic acid/MeOH/acetonitrile (35:5:10)
Column	Shin-pack CLC-ODS(M) (Shimadzu co., 250mm×4.6μ)	
Detector	UV210nm	UV280nm
Flow rate	0.7ml/min	0.8ml/min
Column temperature	35℃	

나. 결과 및 고찰

1) 식초 발효균주 분리 및 동정

가) 식초산균 분리

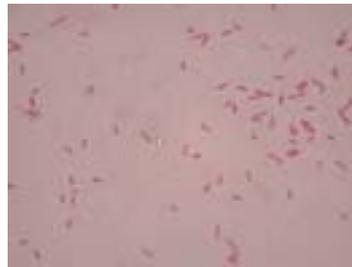
경북과학대학에서 보유하고 있는 3종(A; *Acetobacter* sp. PA97, B; *Acetobacter* sp. AT1, C; *Acetobacter* sp. AT2)의 식초산균과 감귤농축액(D; *Acetobacter* sp. CV1) 및 감귤착즙액(E; *Acetobacter* sp. CV2)의 초산균을 ethanol medium에 streaking하여 clear zone형성 능력을 비교한 결과, Fig. 2에서 보는바와 같이 D의 clear zone 형성 능력이 가장 우수하였으며, C와 E도 넓은 clear zone을 형성하였다. 반면 B는 clear zone 형성능력이 낮았으며, 경북과학대학에서 보유하고 있는 A는 clear zone을 형성하지 않았다.

나) 현미경 관찰

분리균을 현미경으로 관찰한 결과 Gram 음성, 간균으로 전형적인 초산균의 형태를 나타내었다.



단일염색



Gram 염색

Fig. 1. Morphology of *Acetobacter* sp. CV1

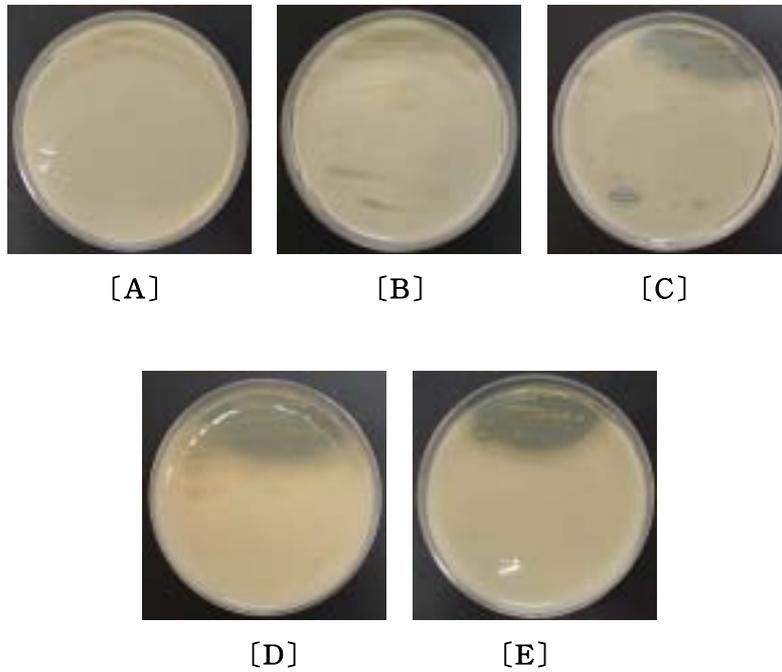


Fig. 2. Clear zone formation by isolated bacterial strains.

Bacterial cells produced acetic acid formed clear zone by dissolving calcium carbonate. Bacterial cells were cultivated for a week by using 3% ethanol medium.

A; *Acetobacter sp.* PA97, B; *Acetobacter sp.* AT1, C; *Acetobacter sp.* AT2

D; *Acetobacter sp.* CV1, E; *Acetobacter sp.* CV2

다) 식초산균 동정

감귤농축주스에서 분리한 초산균 *Acetobacter* sp. CV1과 감귤착즙액에서 분리한 *Acetobacter* sp. CV2를 16S rDNA 유전자 분석하였다.

그 결과, *Acetobacter* sp. CV1의 결정된 염기서열 개수는 700개였으며, 염기서열은 Table 3에서 보는 것과 같으며, Similarity분석 결과는 Table 4에서 보는 것과 같이 *Gluconacetobacter*속에 속하는 세균으로 판명되었으나 현재 존재하는 *Gluconacetobacter*의 10여종 중 97% 이상의 16S rRNA 유사도를 보이는 균주는 없었으며, 다만 계통수 분석결과 *Gluconacetobacter hansenii*의 표준균주와 같은 그룹을 형성하였다. 현재 16S rRNA partial sequence분석만으로는 이 균주를 *Gluconacetobacter* sp.로 판정하였다.

Acetobacter sp. CV2의 결정된 염기서열 개수는 645개였으며, 염기서열은 Table 5에서 보는 것과 같으며, Similarity분석 결과는 Table 6에서 보는 것과 같이 *Gluconacetobacter*속에 속하는 세균으로 판명되었으며, *Gluconacetobacter*는 현재 10여종이 존재하는데 이들 중 *Gluconacetobacter hansenii*의 표준균주와 97.4%의 16S rRNA 유사도를 보였다. 계통수 분석결과 비교적 높은 16S rRNA 유사도를 보이는 *Gluconacetobacter europaeus*의 표준균주와는 97%에 가까운 유사도를 보였으나 다른 그룹을 형성하였으므로, *Acetobacter* sp. CV2는 *Gluconacetobacter hansenii*로 판정하였다.

Table 3. 16S rRNA partial sequencing of *Acetobacter* sp. CV1

GGGACGGGTGAGTAACGCGTACGTATCTGTGCATGGGTGGGGGATAA
 CCTTGGGAAACCGAGGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGG
 CGCAAGTCTCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAAGTGGTTG
 GGTAAAGGCCRACCAACGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATG
 ATCAGCCACACTGGGACTGATACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGC
 AGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATG
 CCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGCGGG
 GACGATGATGACGGTACCGCANAANAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCC
 ACCANCCGCGGTAATACAAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGACTG
 GCGGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTGTTACAGTCAGATGTGAAATTC
 CCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGGCGACTAAAGTG
 TGANANAGGGTTGTGGAATTTCCAGTGTANAGGTGAAATTCGTANA
 TATTGGGAANAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATGAC
 TGACGCTGAGCCNAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATCCCT
 GGTAGTCCACGCTGTAAACAATGTGTGCTGGATGTTGGGTGGCTTG

Table 4. Similarity analysis result of *Acetobacter* sp. CV1

Strain	Accession No	%Similarity
<i>Gluconacetobacter europaeus</i> DSM 6160 (T)	Z21936	96.81
<i>Gluconacetobacter hansenii</i> NCIMB 8746 (T)	X75620	96.66
<i>Acetobacter intermedius</i> 11804 (T)	Y14694	96.66
<i>Acetobacter oboediens</i> DSM 11826 (T)	AJ001631	96.52
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> subsp. <i>xylinus</i> NCIMB 11664 (T)	X75619	96.37
<i>Gluconacerobacter diazotrophicus</i> ATCC 49037 (T)	X75618	94.63
<i>Gluconacetobater liquefaciens</i> IFO 12388 (T)	X75617	94.34

Table 5. 16S rRNA partial sequencing of *Acetobacter* sp. CV2

GTCCACGAACCTTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
 AGGGATCTGTCCATGGGTGGGGGATAACCTTGGGAAACCGAGGCTA
 ATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAG
 GAACCTGCGTTCGATTAGCTGGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAG
 GCGATGATCGATAGCTGGTCTGARAGGATGATCAGCCACACTGGGA
 CTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGEGGGGAATAT
 TGGACAATGGGCSCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAG
 AAGGTTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGACGATGATGACG
 GTACCCGCAAAAAAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCACCACCCGCGGT
 AATACAAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATCAGTGGGCGTAAAGGG
 CGCGTAGGCGGTTGTTACAGTCAGATGTGAAATTCCCGGGCTTAAC
 CTGGGGGCTGCATTTGATACGTGACGACTAAAGTGTGAAAGAGGG
 TTGTGAATTCCAGTGTAAGGTGAAATTCGTAAATATTGGGAAA
 AACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATCACTGACCCTGAG

Table 6. Similarity analysis result of *Acetobacter* sp. CV2

Strain	Accession No	%Similarity
<i>Gluconacetobacter hansenii</i> NCIMB 8746 (T)	X75620	97.04
<i>Gluconacetobacter europaeus</i> DSM 6160 (T)	Z21936	96.88
<i>Acetobacter intermedius</i> 11804 (T)	Y14694	96.73
<i>Acetobacter oboediens</i> DSM 11826 (T)	AJ001631	96.57
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> subsp. <i>xylinus</i> NCIMB 11664 (T)	X75619	96.42
<i>Gluconacerobacter diazotrophicus</i> ATCC 49037 (T)	X75618	95.02
<i>Gluconacetobater liquefaciens</i> IFO 12388 (T)	X75617	93.93
<i>Acetobacter pasteurianus</i> LMG 1262 (T)	X71863	93.30
<i>Acetobacter pomorum</i> DSM 11825 (T)	AJ001632	93.15
<i>Acetobacter aceti</i> JCM 7641 (T)	D30768	93.15
<i>Acetobacter aceti</i> DCIMB 8621 (T)	X74066	92.99

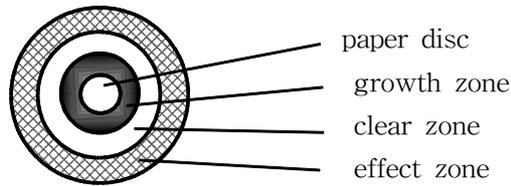
2) 발효 균주별 발효특성 검토

가) 발효력 검토

(1) Paper disc test

경북과학대학에서 보유하고 있는 식초산균 3종(A, B, C)과 감귤에서 분리한 2종(D, E)의 식초산균의 식초산 생성력을 paper disc법으로 검토하였다. 그 결과 Fig. 3 및 Table 7에서와 같이 clear zone의 직경이 각각 0mm, 0.8mm, 1.0mm, 3.5mm, 2.1mm로 분리균 D가 식초산 생성력이 가장 우수하였다.

Table 7. Analysis of clear zone formed by isolated strain. (unit; mm)



	A	B	C	D	E
Paper disc	8	8	8	8	8
Growth zone	-	0.3±0.04	1±00	1±0	0.8±0.13
Clear zone	-	0.8±0.05	1±0.07	3.5±0.17	2.1±0.12
Effect zone	-	1.5±0.03	2±0	2.2±0.04	1.8±0.08

Bacterial cells were inoculated by dipping the paper disc in citrus liquid culture. Inoculated disc was incubated for 72 hours at 30°C after elimination of extra-fluid.

A; *Acetobacter sp.* PA97, B; *Acetobacter sp.* AT1, C; *Acetobacter sp.* AT2

D; *Acetobacter sp.* CV1 E; *Acetobacter sp.* CV2

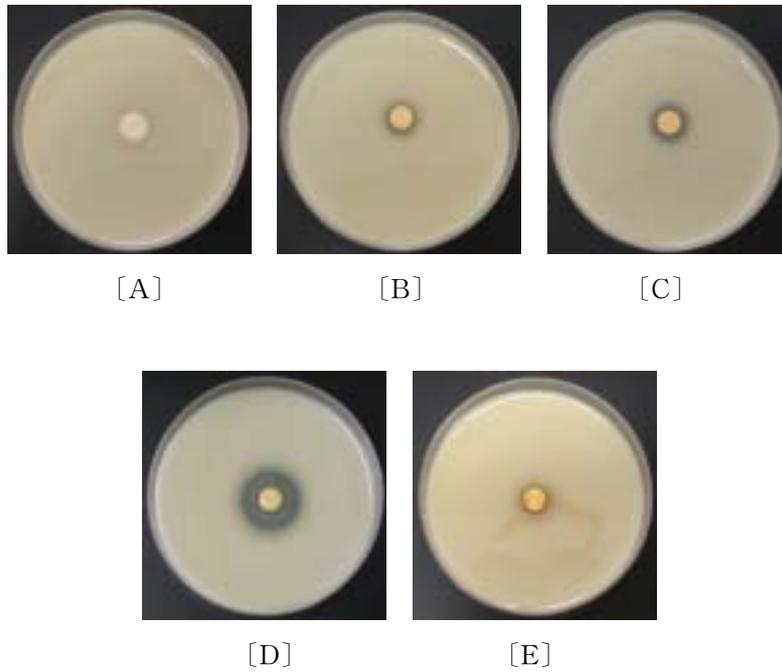


Fig. 3. Clear zone formation by isolation bacterium.

Bacterial cells were inoculated by dipping the paper disc in citrus liquid culture. After removing of extra-fluid, the disc was located on solid ethanol medium which contained calcium carbonate. Inoculated was incubated for for 72 hours at 30°C.

A; *Acetobacter sp.* PA97, B; *Acetobacter sp.* AT1, C; *Acetobacter sp.* AT2
D; *Acetobacter sp.* CV1, E; *Acetobacter sp.* CV2

(2) 분리균주의 식초산 발효력 검정

경북과학대학 보유 초산발효균 3종(A, B, C)과 감귤농축주스(D) 및 감귤 착즙액(E)에서 분리한 초산균 2종의 초산 생성력을 비교 검토하기 위하여, CMY-28로 알콜발효시킨 감귤와인에 균주별 배양액을 10%(v/v)되게 각각 주입하여 30℃, 200rpm에서 96시간 배양하여 종초를 만든후 종초를 다시 감귤와인에 10%(v/v)를 주입하여 발효 경과에 따른 pH, 산도, 잔당 및 알콜함량을 조사하였다.

5종의 식초산균을 8일간 발효시킨 후 pH, acidity, 잔당 및 알콜함량 측정결과 는 Table 8과 같다.

Table 8. 식초산 발효 균주별 발효액의 성상(8일간 발효)

Physiochemical properties	Sample No.				
	A	B	C	D	E
pH	3.35	2.98	2.36	3.02	2.67
Acidity(%)	5.21	5.48	6.15	5.89	5.54
Alcohol(%)	0.20	0.20	0	0	0
Sugar Conc.(°Brix)	5.20	4.40	3.20	3.60	4.10

A; *Acetobacter* sp. PA97, B; *Acetobacter* sp. AT1, C; *Acetobacter* sp. AT2

D; *Acetobacter* sp. CV1, E; *Acetobacter* sp. CV2

경북과학대학 보유균주 3종과 감귤에서 분리한 2종의 균주 모두 발효 기간이 경과함에 따라 pH 및 산도가 높아져 발효 7일에 산도가 각각 5이상이 되었으며, 알콜은 함량이 점점 낮아져 발효 7일째에는 거의 0에 도달하였다. 따라서 분리된 감귤식초발효균주는 2종 모두 우수한 식초산발효력을 가지는 것으로 판단된다.

(3) 선별 균주별 발표특성 검토

감귤농축액과 감귤착즙액에 효모 CMY-28을 접종하여 28℃ incubator에서 36시간 alcohol 발효를 하였다. 각각 알콜발효 초기 당도는 13°brix였으며, 발효 후 당도는 5.6 brix, 5.4°brix였다. 감귤일반알콜발효액과 감귤농축알콜발효액을 각각 원심분리(8,000rpm×15min)후 상층액으로 알콜도수를 측정한 결과 각각 5.4와 5였다.

(가) pH 및 산도 측정

각각의 알콜발효액에 감귤초산균을 접종하여 배양해 놓은 종초를 10%접종하고, 초기산도를 1로 조정한 후 30℃, 200rpm에서 9일간 배양하면서 pH, 산도, 색도의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 5 및 6과 같다.

경북과학대학 보유균주 3종과 감귤에서 분리한 2종의 균주 모두 발효기간이 경과함에 따라 pH, 산도가 높아져 발효 8일에 산도가 각각 5이상이 되었다. 따라서 분리된 감귤식초발효균주는 2종 모두 우수한 식초산 발효력을 가지는 것으로 나타났으며, 반면, 초산발효 초기 알콜함량이 각각 5.4와 5.0에서 산도 6.0 이상 올라간 것은 알콜발효액에 제거되지 않고 남아있는 효모가 초산발효중에도 알콜발효를 동시에 일으켜 알콜함량을 계속 증가시킨 때문으로 사료된다.

(4) 식초 종류별 색상비교

6종의 식초를 색도 비교한 결과는 Table 9에서 보는바와 같이, 감귤착즙·감귤농축식초의 명도 L 값이 가장 높았고, 적색도 a값은 다른 식초와 비슷하였다. 황색도 b값은 비교해 보면 다른 식초에 비해 현저히 낮게 나타났다.

(5) 관능검사

초산발효 9일째 감귤착즙식초와 감귤농축식초를 완성품으로하여 시판중인 사과식초, 감식초, 매실식초, 포도식초와 관능검사를 실시하여 비교한 결과는 Table 10과 같다. 색의 기호도에서는 감귤착즙·감귤농축 식초가 타 식초에 비해 우수하였다. 반면 향·맛과 전반적인 기호도에서는 매실식초가 가장 우수하였으나 향과 맛성분을 첨가하여 시판중인 타식초와 비교 한다면 우수한 결과라 사료된다.

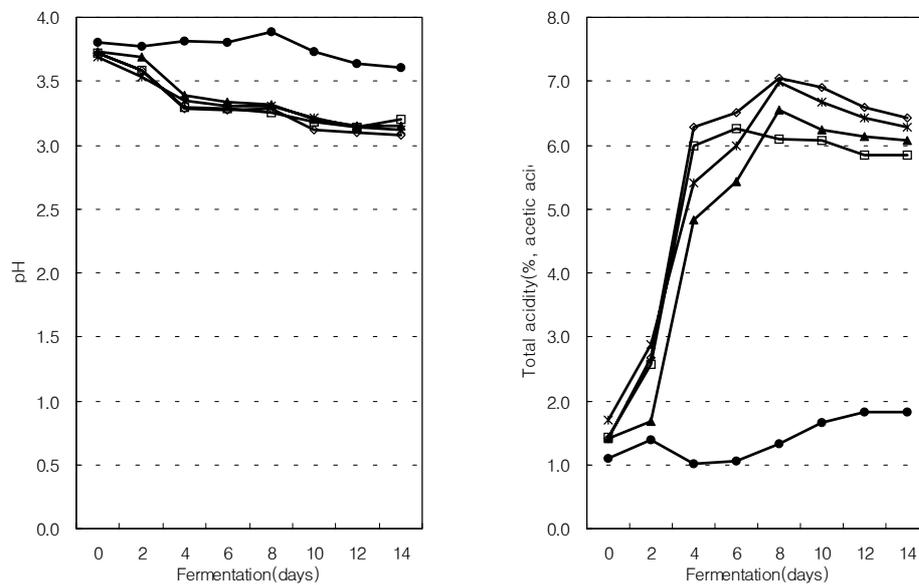


Fig. 5 Changes in pH and total acidity during 14days fermentation of citrus concentration juice by 5 strains of bacteria.

- ; A, *Acetobacter sp.* PA97,
- ; B, *Acetobacter sp.* AT1, -▲- ; C, *Acetobacter sp.* AT2
- ◇ ; D, *Acetobacter sp.* CV1, -×- ; E, *Acetobacter sp.* CV2

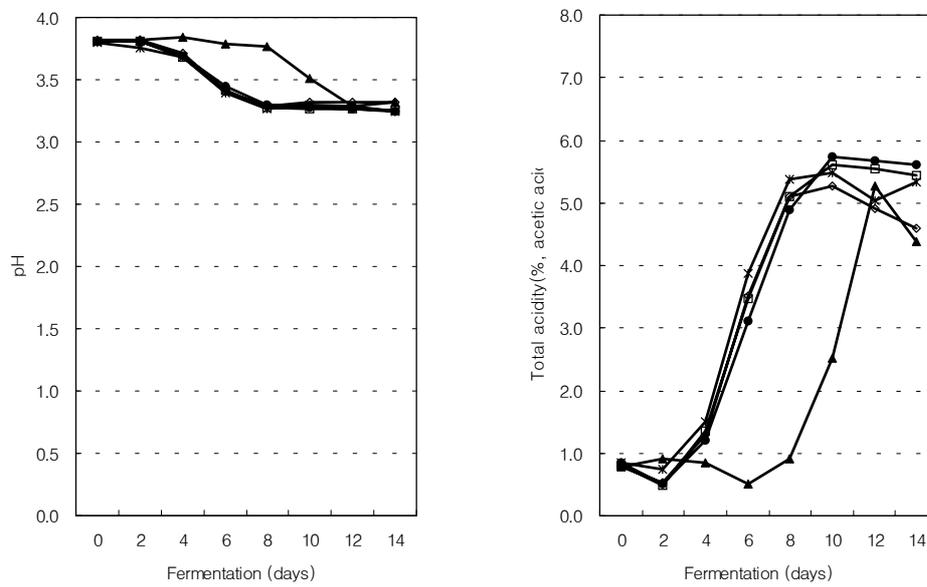


Fig. 6 Changes in pH and total acidity during 14days fermentation of citrus fruit juice by 5 strains of bacteria.

- ; A, *Acetobacter sp.* PA97,
- ; B, *Acetobacter sp.* AT1, -▲- ; C, *Acetobacter sp.* AT2
- ◇ ; D, *Acetobacter sp.* CV1, -×- ; E, *Acetobacter sp.* CV2

Table 9. Hunter color L, a and b value of various vinegars.

	L	a	b
포도식초	76.09±0.03	6.21±0.03	35.13±0.03
감귤착즙식초	92.66±0.05	-2.82±0.01	18.15±0.01
사과식초	89.42±0.05	-2.14±0.02	23.73±0.01
감식초	85.05±0.03	-1.59±0.02	31.36±0.02
감귤농축식초	94.35±0.06	-2.78±0.02	13.86±0.01
매실식초	89.73±0.03	-3.01±0.01	21.58±0.01

Table 10. Sensory properties of various vinegars.

	포도식초	감귤착즙 식초	사과식초	감식초	감귤농축 식초	매실식초	F-value
Color intensity	4.8±0.42 ^a	2.4±0.84 ^c	3.4±0.52 ^b	3.6±0.70 ^b	2.1±0.57 ^c	3.0±0.82 ^b	22.01 ^{***1)}
Color preference	1.8±0.42 ^c	4.2±0.92 ^a	3.1±0.57 ^b	2.8±0.92 ^b	3.9±0.88 ^a	2.8±1.05 ^b	10.82 ^{***}
Sour oder intensity	3.5±0.97 ^a	2.6±0.97 ^{ab}	3.4±0.97 ^a	2.9±1.10 ^{ab}	2.1±1.10 ^b	2.5±0.79 ^{ab}	2.43 [*]
Background oder intensity	3.5±1.08 ^{ab}	2.7±0.82 ^{bc}	3.1±1.10 ^{abc}	3.2±1.03 ^{abc}	2.3±0.82 ^c	4.1±1.10 ^a	3.25 [*]
Oder preference	2.3±0.82 ^c	3.0±0.99 ^{bc}	2.9±0.74 ^{bc}	2.8±0.79 ^{bc}	3.2±1.03 ^b	4.8±0.42 ^a	9.75 ^{***}
Sour taste intensity	3.6±1.08	3.4±0.97	3.6±0.84	3.5±0.85	3.9±0.88	3.0±0.82	0.78 ^{ns}
Background taste intensity	3.3±1.06	2.9±0.99	3.3±0.67	2.6±0.97	3.1±1.10	3.7±0.82	1.33 ^{ns}
Taste preference	2.3±0.82 ^b	3.1±1.10 ^{ab}	3.1±0.86 ^{ab}	2.9±0.88 ^b	3.3±0.95 ^{ab}	3.9±1.00 ^a	2.75 [*]
Overall preference	2.3±0.82 ^b	3.1±0.99 ^b	2.9±0.74 ^b	2.7±0.81 ^b	3.7±0.95 ^b	4.0±0.95 ^a	5.44 ^{***}

1) ns : Not significant statistically.

* : Significant statistically at p<0.05.

** : Significant statistically at p<0.01

*** : Significant statistically at p<0.001.

3) 감귤 기능성 성분의 발효 단계별 이행을 분석

가) 헤스페리딘, 나린진 함량변화 분석

감귤농축액과 감귤착즙액에 함유된 헤스페리딘 함량과 초산균 종류별·초산발효과정 중 헤스페리딘 함량 변화를 관찰한 결과는 Table 11과 같다.

감귤착즙액이 감귤농축액에 비해 헤스페리딘 함량이 37.71과 20.23으로 2배 가량 더 높게 나타났으며, 초산균 종류별·초산발효과정 중 헤스페리딘의 함량 변화는 나타나지 않았다.

나린진 함량분석에서는 감귤농축액과 감귤착즙액 모두 검출되지 않았다.

Table 11. Change in hesperidin of citrus concentration juice and citrus fruit juice by 5 strains of bacteria.

(unit : $\mu\text{g}/\text{ml}$)

	Citrus concentration juice					Citrus fruit juice					
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	
Original liquid	20.23					37.71					
Alcohol fermentation fluid	24.28					44.54					
Acetic fermentation days	0	22.59	23.44	23.27	23.46	21.93	42.66	42.80	41.41	42.98	41.64
	2	23.74	21.13	23.01	22.81	24.58	34.26	42.89	42.16	42.49	48.61
	4	23.37	23.70	22.67	23.18	23.90	41.99	42.57	43.08	42.91	42.61
	6	23.01	23.27	22.95	23.20	23.64	39.89	42.08	42.74	42.88	39.57
	8	24.20	22.89	23.15	23.38	23.17	45.29	40.62	42.61	41.83	41.21
	10						40.13	41.21	42.07	43.69	39.93
12						42.31	41.13	41.82	43.10	39.77	

A; *Acetobacter sp.* PA97, B; *Acetobacter sp.* AT1, C; *Acetobacter sp.* AT2
 D; *Acetobacter sp.* CV1, E; *Acetobacter sp.* CV2

나) 유기산 함량변화 분석

감귤과즙액을 알콜발효 및 식초산 발효한 후 유기산 함량 변화를 관찰한 결과는 Table 12, 13과 같다.

Acetic acid는 알콜발효 및 초산발효의 연속 2단 발효과정을 거치는 동안 농축액과 착즙액 모두에서 크게 증가하였으나 나머지 유기산은 큰 변동이 없는 결과였다.

Table 12. Contents of organic acid in citrus concentration juice vinegars

(unit; ppm)

Sample	Organic acid							
	Oxalic	Tartaric	Malic	ascorbic	Lactic	Acetic	Citric	Succinic
Original liquid	226.21	543.42	1397.17	144.36	-	222.52	12328.00	783.80
Alcohol fermentation fluid	62.05	980.39	1457.26	128.24	275.53	304.54	12182.85	1316.40
A	83.64	1110.03	605.63	133.85	170.98	1789.64	15975.70	852.55
B	220.98	1185.21	1346.56	145.31	176.40	61490.28	16576.70	1398.10
C	223.80	1270.41	1500.23	147.68	122.53	60141.12	16374.95	1415.30
D	221.26	1239.29	1481.71	147.33	-	60245.22	16610.20	1307.40
E	186.74	1138.68	1377.85	152.36	128.46	59653.20	16247.10	1116.35

A; *Acetobacter sp.* PA97, B; *Acetobacter sp.* AT1, C; *Acetobacter sp.* AT2

D; *Acetobacter sp.* CV1, E; *Acetobacter sp.* CV2

Table 13. Contents of organic acid in citrus fruit juice vinegars

(unit; ppm)

Sample	Organic acid							
	Oxalic	Tartaric	Malic	ascorbic	Lactic	Acetic	Citric	Succinic
Original liquid	191.62	1962.05	0.00	410.14	-	-	7345.00	230.20
Alcohol fermentation fluid	39.89	1471.58	707.92	82.53	-	-	6866.95	731.70
A	71.87	1589.12	486.75	80.12	327.55	54433.19	7164.85	379.10
B	81.95	1412.36	439.00	81.47	316.48	54061.73	7281.45	398.70
C	64.56	1439.01	544.80	78.93	186.72	21741.32	7350.00	633.75
D	80.21	1370.80	468.35	82.23	225.96	45974.99	7332.40	435.75
E	62.52	1631.70	396.66	77.11	240.92	54869.52	7355.20	409.15

A; *Acetobacter sp.* PA97, B; *Acetobacter sp.* AT1, C; *Acetobacter sp.* AT2D; *Acetobacter sp.* CV1, E; *Acetobacter sp.* CV2

2. 감귤 식초발효 및 상업생산을 위한 공정개발

가. 재료 및 방법

가) 재료

본 실험에 사용된 감귤은 제주복합가공공장에서 가공된 농축액을 구입하여 사용하였다.

나) 주모 및 종초

박피한 감귤의 과쇄 착즙액에 CMY-28 배양액을 착즙여액에 10%(v/v)되게 접종하여 주모로 사용하였으며, 종초는 감귤알콜발효액에 *Acetobacter* sp. PA97을 접종하여 96시간 통기배양(30℃, 200rpm)한 것의 10%(V/V)를 종초로 사용하였다.

다) 총산 및 알콜함량 측정

총산은 0.1N NaOH용액으로 중화적정하여 초산으로 환산하였으며, 알콜함량 측정은 배양액의 상등액을 증류하여 alcohol hydrometer로 측정하고 그값을 Gay Lussac table로 환산한 값을 나타내었다.

1) 감귤을 이용한 알콜발효 및 초산발효 최적화 설정

가) 실험계획

감귤 알콜발효와 초산발효 제조조건은 Table 14 및 Table 15와 같다. 중심합성 실험계획에 따라 실험을 실시하였으며, 반응표면분석을 위해서 SAS(statistical analysis system) 처리하였다.

Table 14. Levels of alcohol fermentation conditions in experimental design.

Xi	Fermentation conditons	Levels				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	Inital sugar concentration(° Brix)	-	9	12	15	18
X ₂	Fermentation temperature(°C)	17	21	25	29	33
X ₃	Fermentation time(hr)	24	48	72	96	120

Table 15. Levels of acetic acid fermentation conditions in experimental design.

Xi	Fermentation conditons	Levels				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	Fermentation temperture(°C)	24	26	28	30	32
X ₂	Fermentation time(hr)	96	120	144	168	192
X ₃	Agitation rate(rpm)	100	150	200	250	300

나. 결과 및 고찰

1) 감귤을 이용한 알콜발효 및 초산발효 최적화 설정

감귤을 이용한 발효조건을 알콜발효와 초산발효로 구분하여 반응표면 분석에 의해 최적화하고, 발효에 따른 알콜 및 초산의 변화를 모니터링하였다. 알콜발효 모니터링 결과는 Table 16, 17, 18과 Fig. 7, 8, 9에 나타내었으며, 초산발효 모니터링 결과는 Table 19, 20, 21과 Fig. 10, 11에 나타내었다.

반응표면분석 결과 알콜발효의 R²는 0.99 이상이었으며, 초산발효의 R²는 0.92 이상으로 매우 높게 나타났다.

먼저 1단계 알콜발효에서 가장 높은 알콜함량을 나타내는 발효조건은 당도 17.95°Brix, 온도 23.94°C 및 시간 74.53hr이었으며, 알콜함량이 가장 낮은 발효조건은 당도 10.88°Brix, 온도 25.39°C 및 시간 33.01hr이었다. 잔류당 함량이 가장 많은 발효조건은 당도 17.46°Brix, 온도 26.91°C 및 시간 52.22hr이었다. 가장 낮

은 산도를 나타내는 발효조건은 당도 13.76°Brix, 온도 17.02°C 및 시간 70.79hr 이었으며, 산도가 가장 높은 발효조건은 당도 9.14°Brix, 온도 25.77°C 및 시간 83.02hr이었다. 2단계 초산발효에서 가장높은 초산함량을 나타내는 발효조건은 온도 29.90°C, 시간 158.36hr 및 교반속도 221.35rpm이었으며, 초산함량이 가장 낮은 발효조건은 온도 25.31°C, 시간 112.7hr 및 교반속도 165.0 rpm이었다.

최적 발효조건은 알콜발효에서 알콜함량이 가장 높은 당도 17.95°Brix, 온도 23.94°C 및 시간 74.53hr이었으며, 초산발효에서 초산함량이 가장 높은 온도 29.90°C, 시간 158.36hr 및 통기조건 221.35rpm으로 나타났다.

Alcohol fermentation

Table 16. Experimental data on Physicochemical properties of citrus wine under different conditions based on central composite design for response surface analysis.

Fermentation condition			Physicochemical properties		
Initial sugar conc. (°Brix)	Fermentation temperature (°C)	Fermentation time (hr)	Alcohol (%)	Residual sugar conc. (°Brix)	Acidity (%)
9	21	48	3.45	3.8	0.66
9	21	96	3.50	3.6	0.66
9	29	48	3.50	4.0	0.66
9	29	96	3.70	3.8	0.65
15	21	48	6.70	5.4	0.78
15	21	96	6.95	5.2	0.84
15	29	48	6.32	5.8	0.78
15	29	96	6.70	5.6	0.84
12	25	72	5.70	4.0	0.66
12	25	72	5.70	4.1	0.66
18	25	72	9.60	6.0	0.60
12	33	72	5.20	4.4	0.72
12	17	72	5.46	4.2	0.90
12	25	120	4.12	4.9	0.60
12	25	24	3.80	5.0	0.78

Alcohol fermentation

Table 17. Polynomial equations calculated by RSM program for processing of citrus wine.

Response	Polynomial equation ¹⁾	R ²	Significance
Alcohol	$Y_1 = -7.620469 + 0.347500X_1 + 0.358750X_2$ $+ 0.095677X_3 + 0.015556X_1^2 - 0.009167X_1X_2$ $- 0.005781X_2^2 + 0.000660X_1X_3$ $+ 0.000365X_2X_3 - 0.000755X_3^2$	0.9947	0.0000
Residual sugar conc.	$Y_1 = 8.028906 - 0.137500X_1 - 0.220313X_2 - 0.058854X_3$ $+ 0.012500X_1^2 + 0.004167X_1X_2 + 0.003906X_2^2$ $+ 0.000852X_2X_3 + 0.000100X_3^2$	0.9705	0.0026
Acidity	$Y_3 = 1.791813 + 0.099104X_1 - 0.123281X_2$ $- 0.004909X_3 - 0.004083X_1^2 + 0.000104X_1X_2$ $+ 0.002344X_2^2 + 0.000226X_1X_3$ $- 0.000013021X_2X_3 + 0.000013021X_3^2$	0.6530	0.5090

¹⁾X₁ : residual sugar concentration (°Brix)

X₂ : fermentation temperature (°C)

X₃ : fermentation time (hr)

Alcohol fermentation

Table 18. Predicted levels of optimum conditions for the maximized physicochemical properties in preparation of citrus wine by the ridge analysis.

Preparation conditions	Physicochemical properties					
	Alcohol		Residual sugar conc.		Acidity	
	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max
Initial sugar conc.	10.88	17.95	9.02	17.46	9.14	13.76
Fermentation temperature	25.39	23.94	24.41	26.91	25.78	17.02
Fermentation time	33.01	74.53	74.26	52.22	83.02	70.79
Estimated response	3.73	9.44	3.46	6.29	0.59	0.91
Morphology	Saddle point		Saddle point		Saddle point	

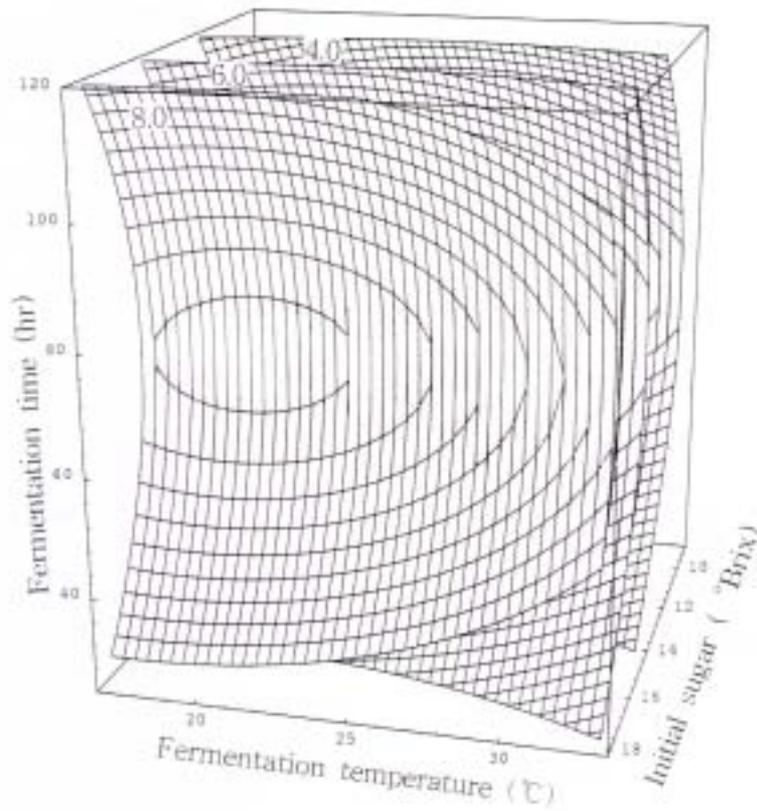


Fig. 7. Response surface for alcohol content in alcohol fermentation using citrus at constant values (alcohol content : 4.0, 6.0, 8.0%) as a function of sugar concentration of citrus, fermentation temperature and fermentation time

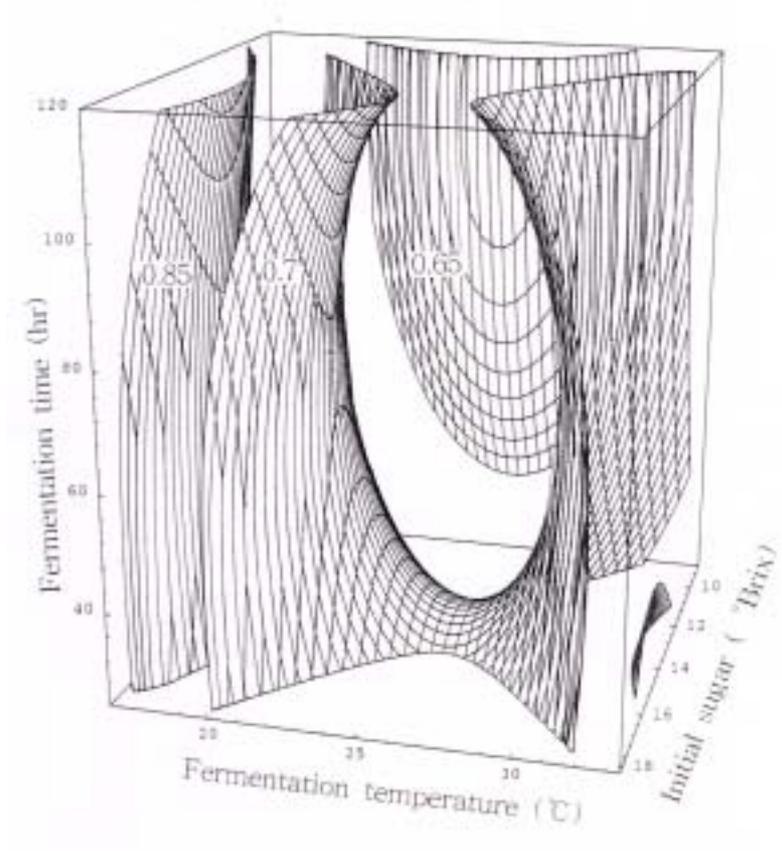


Fig. 8. Response surface for alcohol fermentation using citrus at constant values (acidity : 0.65, 0.7, 0.8) as a function of sugar concentration of citrus, fermentation temperature and fermentation time

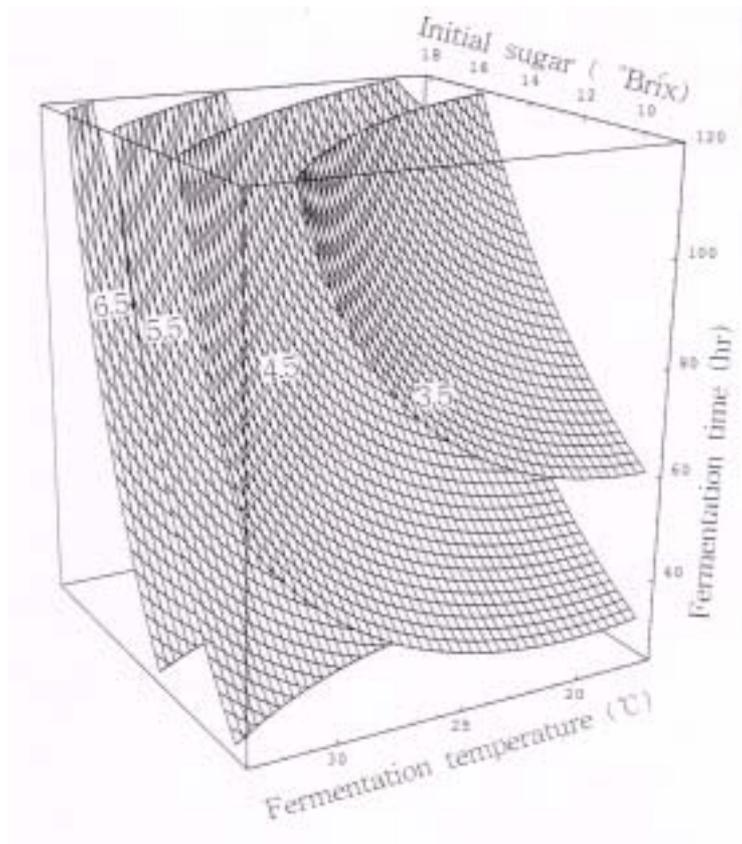


Fig. 9. Response surface for residual sugar content in alcohol fermentation using citrus at constant values (sugar : 3.5, 4.5, 5.5, 6.5%) as a function of sugar concentration of citrus, fermentation temperature and fermentation time

Acetic acid fermentation

Table 19. Experimental data on physicochemical properties of citrus vinegar under different conditions based on central composite design for response surface analysis.

Fermentation condition			Physicochemical properties	
Fermentation temperature (°C)	Fermentation time (hr)	Agitation rate (rpm)	Acidity (%)	Alcohol (%)
26	120	150	2.12	2.13
26	120	250	2.32	2.08
26	168	150	4.68	0.80
26	168	250	4.87	0.70
30	120	150	4.42	1.20
30	120	250	5.21	0.20
30	168	150	5.48	0.20
30	168	250	5.89	0.00
28	144	200	5.25	0.00
28	144	200	5.38	0.00
32	144	200	5.17	0.00
24	144	200	3.24	1.90
28	192	200	5.32	0.00
28	96	200	3.51	1.70
28	144	300	4.25	0.70
28	144	100	2.28	2.53

Acetic acid fermentation

Table 20. Polynomial equations calculated by RSM program for processing of citrus vinegar.

Response	Polynomial equation ¹⁾	R ²	Significance
Acidity	$Y_1 = -111.043125 + 5.0285938X_1 + 0.393620X_2 + 0.066413X_3 - 0.069375X_1^2 - 0.008776X_1X_2 - 0.000391X_2^2 + 0.001012X_1X_3 - 0.000040625X_2X_3 - 0.000205X_3^2$	0.9294	0.0078
Alcohol	$Y_1 = 82.360000 - 3.875938X_1 - 0.251016X_2 - 0.045362X_3 + 0.059375X_1^2 + 0.003932X_1X_2 + 0.000369X_2^2 - 0.001313X_1X_3 + 0.000078125X_2X_3 + 0.000162X_3^2$	0.9629	0.0012

¹⁾X₁ : fermentation temperature (°C)

X₂ : fermentation time (hr)

X₃ : agitation rate (rpm)

Acetic acid fermentation

Table 21. Predicted levels of optimum conditions for the maximized physicochemical properties in preparation of citrus vinegar by the ridge analysis.

Preparation conditions	Physicochemical properties			
	Acidity		Alcohol	
	Min.	Max.	Min.	Max.
Fermentation temperature	25.31	29.90	29.91	26.04
Fermentation time	112.75	158.36	157.05	114.74
Agitation rate	164.96	221.35	223.98	137.70
Estimated response	1.52	5.90	-0.41	2.84
Morphology	Saddle point		Saddle point	

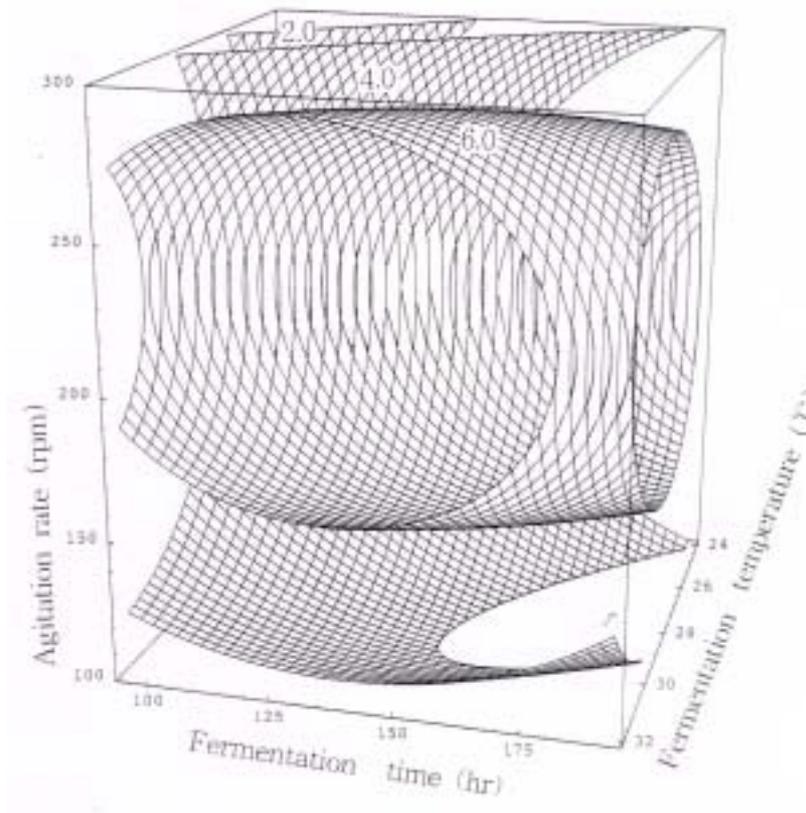


Fig. 10. Response surface for acidity in acetic acid fermentation using citrus at constant values (acid : 2.0, 4.0, 6.0)as a function of agitation rate, fermentation temperature and fermentation time

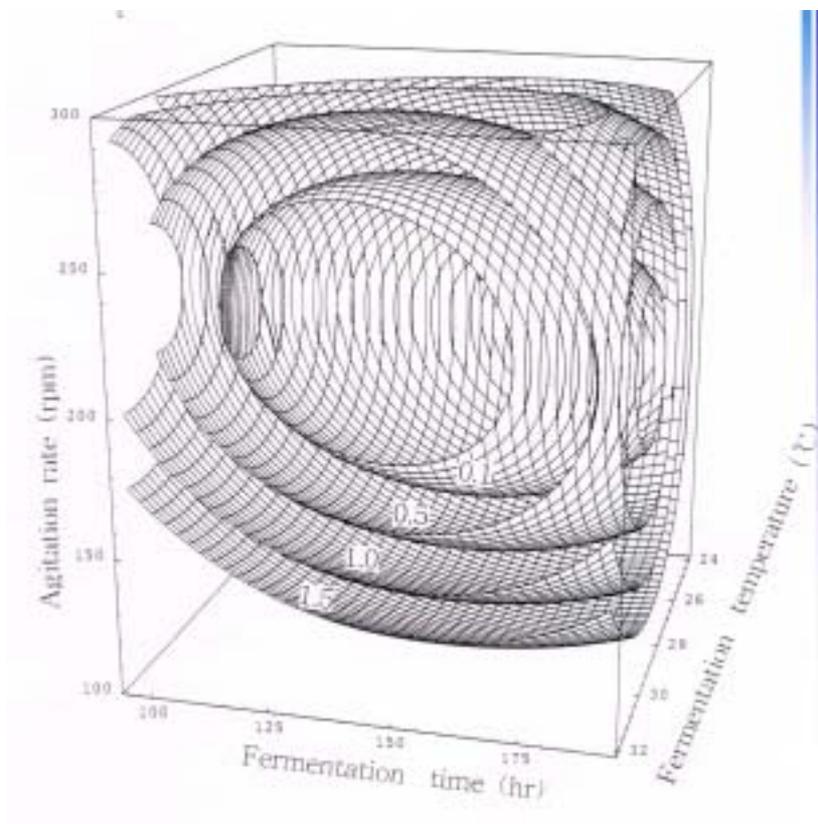


Fig. 11. Response surface for alcohol content in acetic acid fermentation using citrus at constant values (alcohol : 0.1, 0.5, 1.0, 1.5)as a function of agitation rate, fermentation temperature and fermentation time

3. 시제품 생산, 성분 규격 설정 및 상업 생산 공정 개발

가. 감귤식초 및 식초음료 생산

1) Pilot 생산 및 시제품 생산

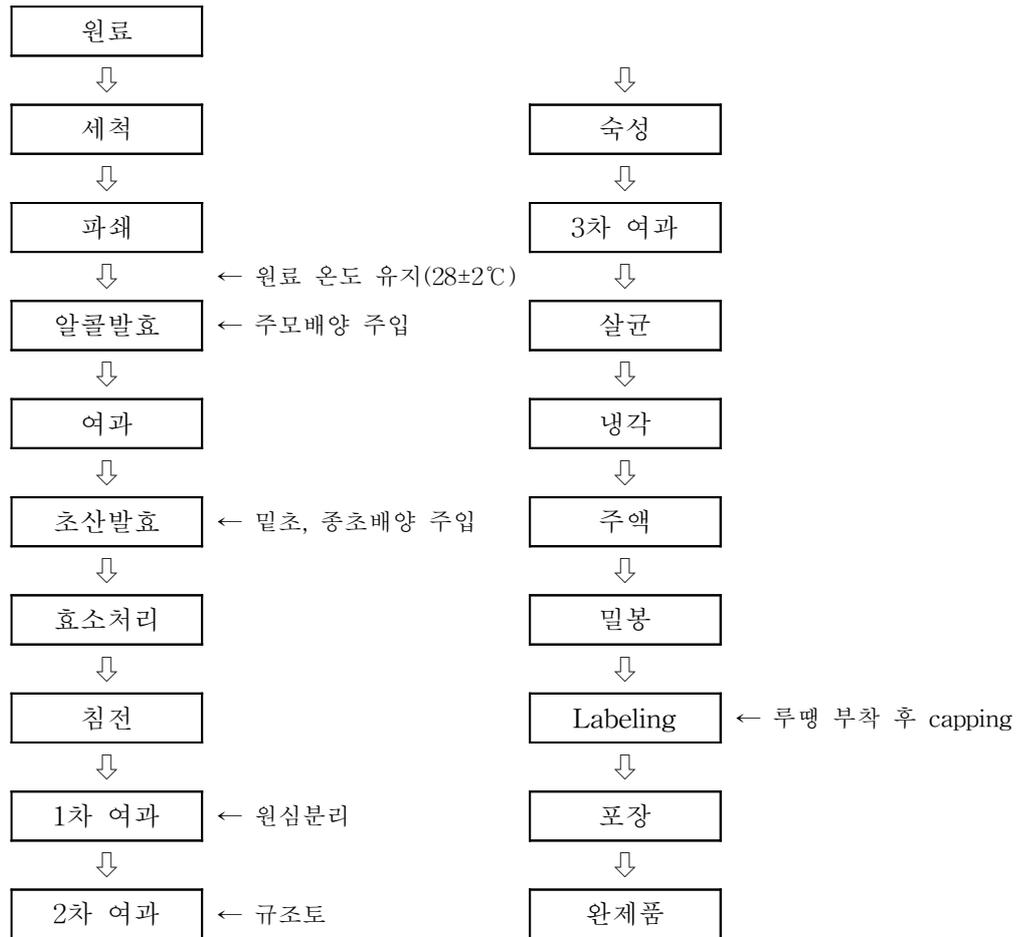
경북과학대학 보유 식품공장에 의뢰하여 시제품을 생산하였다.



Fig. 12. 식초 및 음료 공장라인

가) 식초공정도

최적화 설정된 알콜발효조건(17.95°brix, 23.94℃, 74.53hr) 및 초산발효조건 (29.90℃, 158.36hr, 221.35rpm)에 맞추어 감귤농축액 이용 식초를 제조하였다.



나) 음료공정도

기능성 식초함유 음료를 개발하기 위해 발효된 감귤식초와 함께 칼슘과 비타민을 첨가하였다. 제품명은 칼슘강화 제주감귤(가제)이며, 주원료는 감귤농축액, 감귤식초, 젖산칼슘, 비타민C 등이다. 사용된 감귤농축액 원료는 당도 60°brix, 산도 4.6%이었으며, 배합규격은 Table 22로 최종 제품의 당도는 15°brix, 산도 0.85%, pH 3.5, 비중 1.061이다.

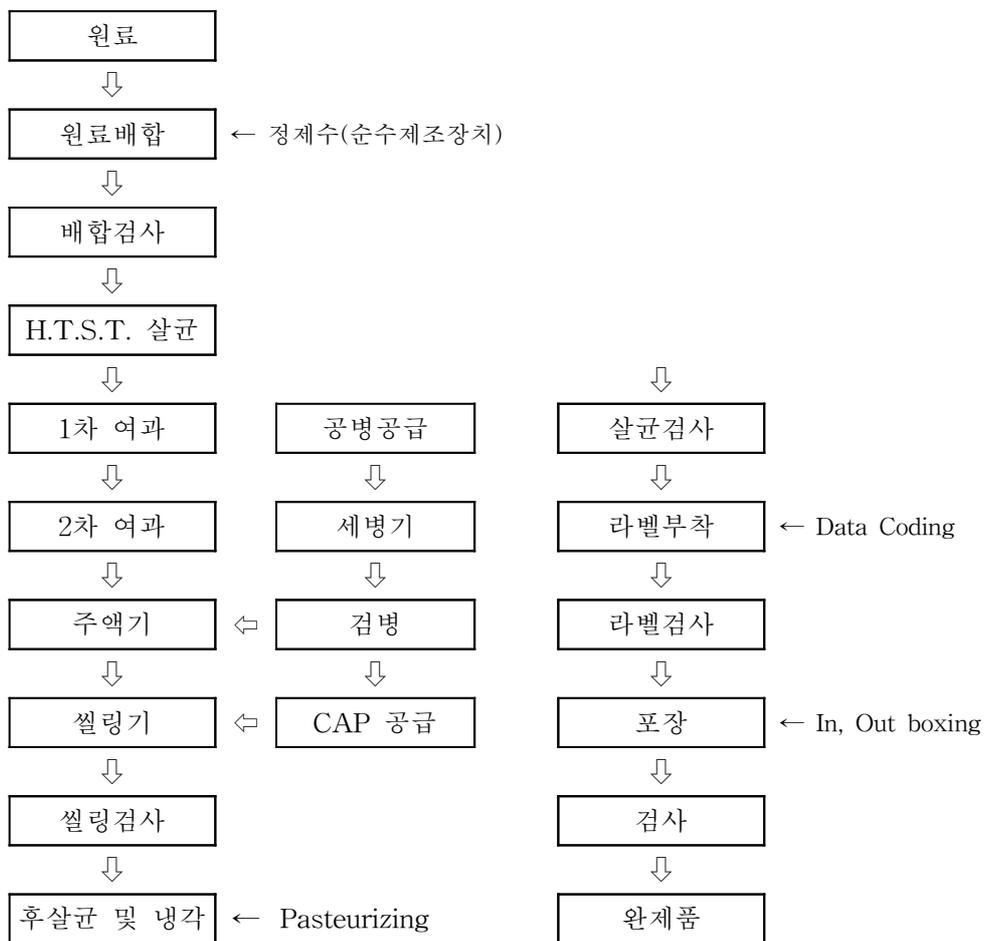


Table 22. 칼슘강화 제주감귤 배합규격

원재료명	배합비(%)	사용량(Kg)	비고
감귤농축액(60°brix)	3.750	52.500	과즙기준당도 9°brix, 25% 함유
액상과당	12.000	168.000	
설탕	2.500	35.000	
잔탄검	0.050	0.700	설탕혼합 후 용해(80℃)
감귤식초	2.000	28.000	산도 5% 기준, 활성탄처리 냄새제거
오렌지향(감귤향)	0.100	1.400	후드코리아
젖산칼슘	0.868	12.152	맨 처음 정제수 용해
구연산	0.650	9.100	
비타민C	0.015	0.210	
정제수	78.067	1092.938	
합 계	100.000	1400.000	

나. 제품 품질조사 및 공정개선에 의한 보완 및 저장성 검토

1) 제품의 품질검사

칼슘강화 제주감귤을 20대 32명을 대상으로 제품의 색, 향, 맛, 전체적인 기호도에 대하여 9점 척도법으로 평가하였으며, 각 특성이 높을수록 높은점수를 주었다.

그 결과, Fig. 12에서 보는바와 같이 색 6.13, 향 5.44, 부드러운 정도 5.47, 달콤한 정도 5.31, 신정도 6.63, 전체적인 기호도 5.81을 나타내었다. 신맛을 아주 강하게 느끼지는 않았지만 6.63으로 높은 점수를 나타내었으며, 이로인해 부드러운 맛과 달콤한 맛이 상대적으로 낮게 평가된 것으로 사료되나 종합미각에 있어서는 호응도가 상당히 높은 것으로 평가되어 음료 제품화의 가능성을 보였다.

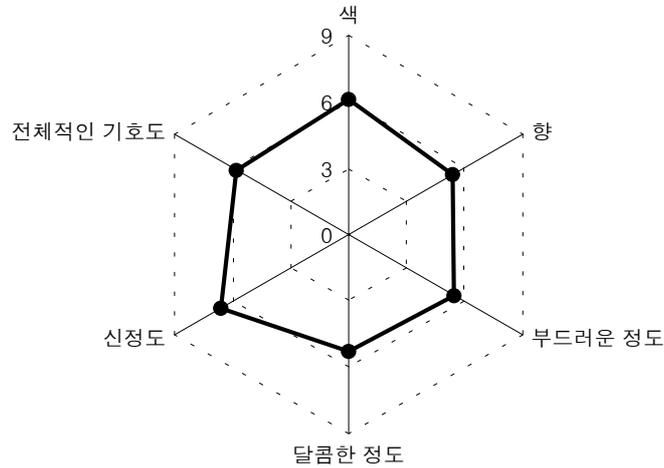


Fig. 13. 갈습강화 제주감귤 관능 결과

2) 식초산균의 저장성 검토

감귤농축액을 이용한 식초발효액에서 분리한 식초산균의 활성도와 저장성을 알아보기 위하여 60일, 120일, 180일간 냉장보관된 분리균을 ethanol 액체배지에 30℃에서 5일간 진탕배양한 뒤 다시 ethanol 고체평판배지에 streaking하여 5일간 정치배양한 후 생성된 colony 주위의 clear zone 넓이와 투명도로 알아보았다.

그 결과, Fig. 13과 같이 냉장보관된 식초산 분리균의 산 생성능력이 우수한 것으로 나타났다. 그러나 시간이 오래 경과할수록 균체 형성 시간이 오래 걸렸으며, clear zone 형성속도(산생성능) 또한 늦어짐을 확인할 수 있었다.



Fig. 13. 60일, 120일, 180일 냉장보관 후 초산균의 clear zone 생성능력

다. 시제품 생산

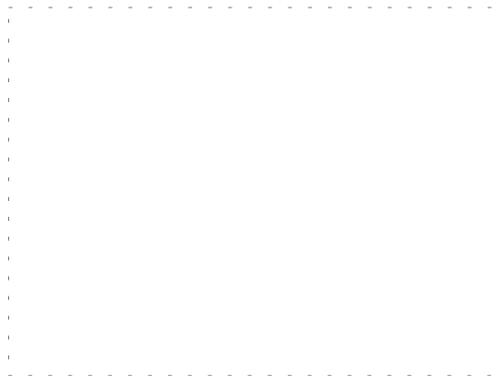
1) 감귤식초 및 칼슘강화 제주감귤 시제품



3) 감귤식초 Out Box



4) 칼슘강화 제주감귤 Out Box



4. 참고문헌

- 1) Yong-Jin Jeong, Production of beverages and fruits vinegar using kyungpook special products(Persimmom, Apple and Grape). *Food Industry and Nutriunt.*, 5(2).53~59 (2000)
- 2) Yong-Jin Jeong, Gee-Dong Lee and Kwang-Soo Kim, Optimization for the fermentation condition of persimmon vinegar using response surface methodology. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.*, 30(5), 1203~1208 (1998)
- 3) Seung-Hyek Kwon Eun-Jae Jeong Gee-Dong Lee and Yong-Jin Jeong, Preparation method of fruit vinegars by two stage fermentation and beverages including vinegar. *Food Industry and Nutriunt.*, 5(1), 18~24 (2000)
- 4) Yong-Jin Jeong, Ji-Hyung Seo, Joo-Baek Lee, Sang-Moon Jang, Seung-Ryeul Shin and Kwang-Soo Kim, Changes in the components during alcohol fermentation of potatoes using pilot system. *KOREAN J. POSTHARVEST SCI. TECHNOL.*, 17(2), 233~239 (2000)
- 5) Ji-Hyung Seo, Gee-Dong Lee and Yong-Jin Jeong, Optimization of the vinegar fermentation using concentrated apple juice. *J. Kolean Soc Food Sci. Nutr.*, 30(3), 460~465 (2001)
- 6) Gee-Dong Lee, Seung-Hyek Kwon, Myung-Hee Lee, Suk-Kyung Kim and Joong-ho Kwon, Monitoring on Alcohol and acetic acid fermentation properties of muskmelon. *KOREAN J.FOOD SCI TECHNOL.*, 34(1), 33~36 (2002)
- 7) Myung-Hee Lee and Hong-Kyoon No, Quality changes during storage of persimmon vinegar clarified by chitosan treatment. *J. Kol eac Soc. Food Sci. Nutr.*, 30(2), 283~287 (2001)

- 8) Myung-Hee Lee and Hong-Kyoon No, Clarification of persimmon vinegar using chitosan. *J. Korean Soc Food Sci. Nutr.*, 30(2), 277~282 (2001)
- 9) Suk-Gi Kim, Young-Chul Lee, Kwang-Gi Suh and Hye-Seon Choi, Acetaldehyde dehydrogenase activator from persimmon and its processed foods. *J. Korean Soc Food Sci. Nutr.*, 30(5), 954~958 (2001)
- 10) Yong-Jin Jeong, Ji-Hyung Seo, Sung-Ran Yoon, Jin-Man Lee, Gee-Dong Lee, Ok-Mi Kim and Kwang-Woong Bang, Liquefaction and saccharification conditions of potatoes for alcohol fermentation using potatoes. *KOREAN J. POSTHARVEST SCI. TECHNOL.*, 7(1) 94~98 (2000)
- 11) Jeong-Hwa Hong, Gi-Min Lee and Sung-Ho Hur, Production of vinegar deteriorated destringent persimmons during low temperature storage. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 25(1), 123~128 (1996)
- 12) Hye-Young Kim, Min-Jung Kim and Eun-Yeol Woo, Physicochemical and sensory properties of freshly squeezed orange juice using domestic and imported oranges. *KOREAN J. DIETARY CULTURE.*, 15(3), 189~194 (2000)
- 13) Mee-Ra Rhyu, Eun-Young Kim, In-Young Bae and Yong-Kon Park, Contents of naringin, hesperidin and neohesperidin in premature Korean citrus fruits. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.*, 34(1). 132~135 (2002)
- 14) Man-Suck Park, Young-Jong Son and Young-Jong Lee, The effects of gamgiltang and kami-gamgiltang on antipyretics, anti-inflammation and discharge of phlegm. *Kor. J. Herbology.*, 17(1), 65~77 (2002)
- 15) Soon-Kyung Chung, Seung-Hwa Kim, Young-Hun Chio, Eun-Young Song and Soo-Hyun Kim, Status of citrus fruit production and view of utilization in cheju. *Food Industry and Nutriunt.*, 5(2) 42~52 (2001)

- 16) Jong-Bang Eun, Young-Min Jung and Gun-Jo Woo, Identification and determination of dietary fibers and flavonoides in pulp and peel of Korean tangerine (*Citrus aurantium* var.). *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.*, 28(2), 371~377 (1996)
- 17) Jeong-Sam Koh and Seong-Hak Kim, Physicochemical properties and chemical compositions of citrus fruits produced in Cheju. *Agricultural Chemistry and Biotechnology.*, 38(6), 541~545 (1995)
- 18) Jeong-Sam Koh, Nam-Kwon Koh and Soon-Sun Kang, Citrus wine-making from mandarin orange produced in cheju island. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 32(4), 416~423 (1989)
- 19) Hyun-Yu Lee, Ho-Moon Seog, Young-Jung Nam and Dong-Hyo Chung, Physico-chemical properties of korean mandarin(*Citrus reticula*) orange juices. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.*, 19(4), 338~345 (1987)
- 20) Jae-Young Cha and Young-Su Cho, Biofunctional activities of citrus flavonoids. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 44(2), 122~128 (2001)
- 21) Kyoung-Suck Sohn and Jun-Ho Lee, Application of advanced processing technology in the production of juices. *Food Industry and Nutrition.*, 7(3), 20~26 (2002)

설 문 지

안녕하십니까?

바쁘신 중에도 본 설문에 응해 주신데 대하여 진심으로 감사드립니다. 본 설문조사는 감귤음료 소비 실태 및 신제품 개발품의 소비자 선호도에 대한 조사입니다. 귀하의 응답내용은 논문자료 외에는 사용하지 않으며, 설문 내용을 어렵게 생각하지 마시고 느끼시는 대로 기입하여 주시면 되겠습니다. 귀하의 협조에 감사드립니다.

※ 해당 번호에 √표나 기입해야 할 문안에 직접 기입해 주십시오.

1. 설문대상 조사

성 별	남 <input type="checkbox"/>	여 <input type="checkbox"/>
나 이	만	세

※ 감귤식초함유 음료를 시음한 후 각 특성이 강할수록 높은 점수에 √표 해 주세요.

2. 관능 검사

	아주 나쁘다 (약하다)			보통이다				아주 좋다(강하다)		평점
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
색	<input type="checkbox"/>									
향	<input type="checkbox"/>									
맛	부드러운 정도	<input type="checkbox"/>								
	달콤한 정도	<input type="checkbox"/>								
	신 정도	<input type="checkbox"/>								
전체적인 기호도	<input type="checkbox"/>									

의견 ;

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

기술적 측면에서의 감귤식초 및 식초음료로 상품화하기 위해 선행되는 감귤식초용 원주발효공정 개선 및 균주개발은 우수한 품질의 발효품 생산에 기여하고 고급 알콜 발효 기술 과 식초산발효 기술 개발 및 우리고유의 우수한 감귤품종 선별은 잔당 및 식초산 이외의 바람직하지 못한 유기산 함량을 낮출 수 있어 상큼한 맛의 천연 식초 개발을 달성 하였고 이에 덧붙여 감귤 및 발효품의 기능성 검정으로 생리 활성 효과를 검토 하였고 감귤겔 발효기술을 확립하였다

경제 · 산업적 측면에서 보면 고품질의 감귤 발효 가공품의 대량 생산으로 고부가가치 창출이 이루어질 수 있는 기반을 조성 하였고 이로 인해 농산물 수급의 안정으로 물가안정 및 농가소득 증대 또한 제주도 고유의 고급 식초 개발로 관광상품화 및 우리고유의 식초로 수출이 기대되고 있다.

감귤을 이용한 신수요 창출 및 기능성 품목 개발로 소비자의 건강식품에 대한 요구만족 및 수요창출로 부가가치 증대가 기대된다.

- 1년차 시험결과

감귤의 품종, 숙기에 따른 원주 발효력 비교 및 착즙방법에 따른 착즙율 검토로 원주용 과즙제조 방법의 표준화를 기하였고 기 개발 CMY-28균주의 온도별 발효속도 및 원주조성을 검토하여 원주발효용 감귤과즙 품질기준 설정 하였다.

3종류의 균주를 선발하여 식용 겔 생산균 분리 및 동정을 하였고 이에 따른 식용 겔 발효조건을 확인하여 감귤식용겔용 균주선발 및 발효조건 검토하였다.

감귤에 부착되어있는 식초발효 미생물을 분리한 후 동정하여 발효균을 선별하였고 균주별 발효특성 검토하여 발효균주를 선정 하였다.

감귤에 다량 함유되어있는 플라보노이드의 주성분인 나리진 헤스페리딘 분석 및 검토를 통해 발효 단계별 이행을 분석 감귤 기능성 성분 유지 식초산 발효기술을 개발 하였다.

- 2년차 시험결과

원주 발효공정 개선은 산업화의 기본으로 우선 시간이 매우 중요한데 이것을 위해 발효조 온도별 발효 속도측정하여 최적 발효 기간을 구명 하였고 또한 품질을 높이기

위해 복합 발효에 의한 원주발효조건을 수립 하였다.

또한 개발품의 산업화를 위한 안전성 검정 및 기능성 검토를 위해 Ames test 및 생균수를 검정하고 항균력, 혈전 용해성 검정 및 동물실험을 통한 약리적인 효능 검토를 하였고 산업화를 위한 경제성 자료작성을 한 후 계속적으로 새로운 소재로의 이용성을 검토하였다.

식초 발효 산업화 공정 개발을 위해 우선적으로 수행 되어야할 선결 과제인 최적 발효조건을 설정하기 위해 Pilot plant 및 상업생산 규모에서 발효조건을 검토 하였고 이를 바탕으로 개발품의 시장성조사를 통해 상업생산규모 확정 하였다.

시제품생산 및 상업 생산 공정개발에서는 Plant 생산을 통해 감귤식초 및 drink 류를 출시 하였고 재차 제품 품질조사 및 공정개선에 의한 보완을 통해 최종 제품을 결정 하였으며 저장성검토를 통해 유통기간을 설정하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

현재 연구결과 선별된 균주를 이용한 식초이외에 다양한 발효제품의 개발이 필요하며 발효 부산물의 생리활성을 이용한 새로운 기능성 식품개발이 요구된다.

연구결과 개발된 균주는 과잉 생산되는 유사과실을 이용한 발효제품 개발에 유용하게 이용될 수 있으며, 연구결과 확립된 master plan은 중소기업의 창업 item으로 이용하고 생산현장의 애로과제 해결을 통한 상업생산 발효공정의 효율적 관리에 사용될 예정이다. 또한 추후 균주의 정밀한 검토를 통해 균주 및 개발제품에 대한 국내외 특허출원을 기하고, 신 감귤가공식품 marketing 검토를 시판제품 생산 및 market test를 통해 적극 추진 한 후 개발된 기술을 감귤 이외에도 국내산 과잉 생산 과실류를 이용한 발효제품 개발에의 적용에 적극 활용하고 감귤에 대해서는 제주 현지 생산공장설치 협력하고 금 후 새로운 자원으로서의 희망이 보이는 감귤이용 식용겔의 응용연구를 본격적으로 시작할 필요성이 요구된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

식초산 및 식초산 음료에 관해서는 세계적으로 주정초가 주류를 이루고 있으며 또한 천연과즙 식초는 원재료가 가진 구조적인 문제점(cellulose성분, 당 및 특이색소)으로 청징여과가 어려운 것으로 평가되고 있다고 보고되고 있음.

현재 일본에서도 과실식초를 희석액을 사용하여 발효하고있다고 보고되고 있음.

Philippines에서는 coconut gel 생산과 관련된 균주개선 등의 기술적 업무를 Bureau of Plant & Industry(BPI) 산하 Lab. of Microbiology에서 관리하고 있음을 파악하고 자국의 산업보호의 차원에서 발효균주 및 생산기술의 확산 억제와 외국인의 생산현장 출입을 엄격히 통제(한국대사관 확인).

Russia에서 tea fungus를 이용하여 vitamin을 함유한 겔 생산을, 일본에서는 Acetobacter xylinum을 사용한 딸기 겔 생산을 보고하고 있음.

제 7 장 참고문헌

Gun-Jo Woo and Seung-Mi Ha, Debittering of citrus products using β -cyclodextrin polymer and Ultrafiltration process. Korean J. Food Sci. Technol., 29(2), pp 302-308(1997).

Jeong-sam Koh and Seong-Hak Kim, Physiochemical properties and chemical composition of citrus fruits produced in cheju, Agricultural Chemistry and Biotechnology, 38(6), pp 541-545(1995).

Jeong-sam Koh, Jeong-Eun Koh, Sang-Ho Yang and Sung-Ung Ahn, Physiochemical properties and sensory evaluation of *Citrus unshin* produced in cheju, Agricultural Chemistry and Biotechnology, 37(3), pp 161-167(1994).

Eun-Young Song, Young-Hun Choi, Kyung-Hee Kang, Jeong-Sam Koh, Quality characteristics of citrus fruits according to the harvest date and variety, Agricultural Chemistry and Biotechnology, 40(5), pp 416-421(1997).

Hyun-Yu Lee, Ho-Moon Seog, Young-Jung Nam and Dong-Hyo Chung, Physico-chemical properties of Korean mandarin(*Citrus reticula*) orange juices, Korean J. Food Sci. Technol., 19(4), pp 338-345(1987).

Young-Hwan Ko and Se Jae Kim, Collection and identification of molds from citrus oranges during post-harvest storage, Korean J. Food Sci. Technol., 28(6), pp 1142-1145(1996).

Eun-Young Song,, Young-Hun Choi, Kyung-Hee Kang and Jeong-Sam Koh, Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of cheju citrus fruits according to harvest date, Korean J. Food Sci. Technol., 30(2), pp 306-312(1998).

Jong-Bang Eun, Young-Min Jung and Gun-Jo Woo, Identification and determination of dietary fibers flavonoids in pulp and peel of korean tangerine(*Citrus aurantium var.*), Korean J. Food Sci. Technol., 28(2), pp 371-377(1996).

Gun-Jo Woo, Jin Nam and Jong-Bang Eun, Optimization of membrane separation process for the production of dietary fibers from tangerine peels, Korean J. Food Sci. Technol., 28(2), pp 378-383(1996).

Ting, S. V., Rouseff, R. L., Dougherty, M. H. and Attaway, J. A., Determination of some methoxylated flavones in citrus juices by high performance liquid chromatography, J. Food Sci., 44, 69(1986).

David, W. B., Anal. Chem, 38, 726(1966).

井上雅資, 岡田武孝, 科工, 43, 642(1969).

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.